

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg**  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

Direktor: Univ. –Professor Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Neff

Der verstärkende Effekt einer Low-Level-Laserbestrahlung auf die Wirkung von  
Cisplatin und Zolendronsäure *in-vitro*.

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

Dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Dr. med. Paul Günther Baptist Heymann  
geboren am 17.08.1984 in Mainz

Marburg Mai 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
8.05.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer  
Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Florian G. Draenert  
Korreferent: Prof. Dr. Andreas Braun

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>1. KAPITEL: EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1. PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN.....	6
1.1.1. Elektromagnetische Strahlung.....	6
1.1.2. Laserstrahlung .....	6
1.2. KLINISCHE ANWENDUNG VON LASERSTRAHLUNG .....	7
1.3. EINFLUSS DER LASERSTRAHLUNG AUF DEN ZELLULÄREN STOFFWECHSEL.....	8
1.4. PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT).....	9
1.4.1. Wirkprinzip der PDT .....	9
1.4.2. Photosensibilisatoren .....	9
1.4.3. Bestrahlung.....	9
1.4.4. Klinische Anwendung der PDT .....	10
1.5. ZYTOSTATIKA .....	10
1.5.1. Cisplatin.....	10
1.5.2. Zolendronsäure.....	13
1.6. FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT.....	16
<b>2. KAPITEL: MATERIAL UND METHODIK.....</b>	<b>18</b>
2.1. VERSUCHSAUFBAU .....	18
2.2. ZELLKULTUR .....	19
2.2.1. Einstellung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer .....	20
2.2.2. Einfrieren der Zellen .....	20
2.2.3. Auftauen der Zellen .....	20
2.3. XTT-MESSUNG .....	21
2.3.1. Prinzip .....	21
2.3.2. Durchführung.....	21

2.4. HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (H.E.-FÄRBUNG).....	22
2.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	22
<b>3. KAPITEL: ERGEBNISSE.....</b>	<b>24</b>
3.1. XTT-MESSUNG .....	24
3.1.1. Zytostatikatherapie.....	24
3.1.2. Lasertherapie .....	24
3.2. HISTOLOGIE .....	28
3.2.1. Zytostatikatherapie.....	28
3.2.2. Lasertherapie .....	30
<b>4. KAPITEL: DISKUSSION.....</b>	<b>36</b>
4.1. PROBLEMATIK IN DER ZYTOSTATIKATHERAPIE VON KOPF-HALS-TUMOREN.....	36
4.2. NEUE THERAPIEANSÄTZE IN DER BEHANDLUNG VON KOPF-HALS-TUMOREN.....	36
4.3. ZYTOSTATIKA ALS MÖGLICHE PHOTOSENSIBILISATOREN .....	37
4.4. EINFLUSS VON CISPLATIN UND ZOLENDRONsäURE AUF DIE ZELLULäRE BIOVIABILITäT .....	38
4.5. EINFLUSS EINER BESTRAHLUNG AUF DIE ZYTOTOXIZITäT VON CISPLATIN UND ZOLENDRONsäURE...	39
4.6. SCHLUSSFOLGERUNG.....	40
<b>5. KAPITEL: ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>42</b>
5.1. ZUSAMMENFASSUNG .....	42
5.2. SUMMARY .....	43
<b>6. KAPITEL: DANKSAGUNG .....</b>	<b>45</b>
<b>7. KAPITEL: LEBENS LAUF .....</b>	<b>46</b>
<b>8. KAPITEL: VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....</b>	<b>46</b>
<b>9. KAPITEL: LITERATURVERZEICHNISFEHLER!      TEXTMARKE      NICHT DEFINIERT.</b>	
<b>10. KAPITEL: ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>11. KAPITEL: EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>60</b>

# 1. Kapitel: Einleitung

## 1.1. Physikalische Grundlagen

### 1.1.1. Elektromagnetische Strahlung

Elektromagnetische Strahlung bildet ein elektromagnetisches Spektrum, das von der Radiostrahlung bis zu der Röntgenstrahlung reicht. Als Licht wird der sichtbare Teil dieser elektromagnetischen Strahlung bezeichnet.

Physikalisch besteht ein Dualismus, da elektromagnetische Strahlung sowohl eine Teilchen- als auch eine Wellenstrahlung ist. Wie jede andere Welle lässt sich Licht demnach durch die Wellenlänge ( $\lambda$ ) und die Frequenz ( $f$ ) charakterisieren. Die Wellenlänge ( $\lambda$ ) bezeichnet den Abstand zwischen zwei Punkten einer Welle, bei denen der gleiche Schwingungszustand vorliegt. Sie wird in Nanometern (nm) angegeben. Die Frequenz ist ein Maß für die Anzahl der Schwingungen pro Zeiteinheit mit der Einheit Hertz ( $\text{Hz} = 1/\text{s}$ ). Zwischen der Frequenz ( $f$ ), der Wellenlänge ( $\lambda$ ) und der Ausbreitungsgeschwindigkeit ( $v$ ) besteht folgende Beziehung:  $v = \lambda \cdot f$  (Ramsay, 2013). Moderne physikalische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Ausbreitung der elektromagnetischen Strahlung nicht gleichmäßig erfolgt, sondern in Form von kleinsten Energieträgern (Quanten) oder auch Photonen genannt. Sie stellen den korpuskulären Charakter des Lichtes dar (Chung et al., 2012).

Nur ein kleiner Teil dieser elektromagnetischen Strahlung ist für das menschliche Auge sichtbar. Er erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich für violettes Licht mit  $\lambda = 380 \text{ nm}$  bis hin zu roten Tönen mit einer Wellenlänge von  $625 \text{ nm}$  (Sowa et al., 2013).

### 1.1.2. Laserstrahlung

Laserstrahlung ist eine Quelle für kohärente und scharf gebündelte elektromagnetische Strahlung, die durch eine hohe Intensität und einen sehr engen Frequenzbereich (monochromatisches Licht) gekennzeichnet ist. Die Abkürzung **Laser** steht für **L**ight **a**mplification by **s**timulated **e**mission of **r**adiation (McGuff et al., 1963). Laserstrahlung wird erzeugt, indem man Atome durch das Einstrahlen von Licht in einem Glasrohr in einen metastabilen, angeregten Zustand überführt. Dabei

kreisen die Elektronen auf Orbitalen eines höheren Energieniveaus. Durch ein Lichtquant (Photon) einer bestimmten Frequenz werden alle Atome gleichzeitig zur Emission von Licht stimuliert. Dabei fallen die angeregten Atome wieder in ihren Grundzustand zurück und senden dabei ein Photon der identischen Energie (also identischer Wellenlänge und Frequenz) wie das stimulierende Photon aus. Dabei entsteht Licht von großer Lichtstärke, welches sich extrem gut parallelisieren lässt (Farkas et al., 2013).

## **1.2. Klinische Anwendung von Laserstrahlung**

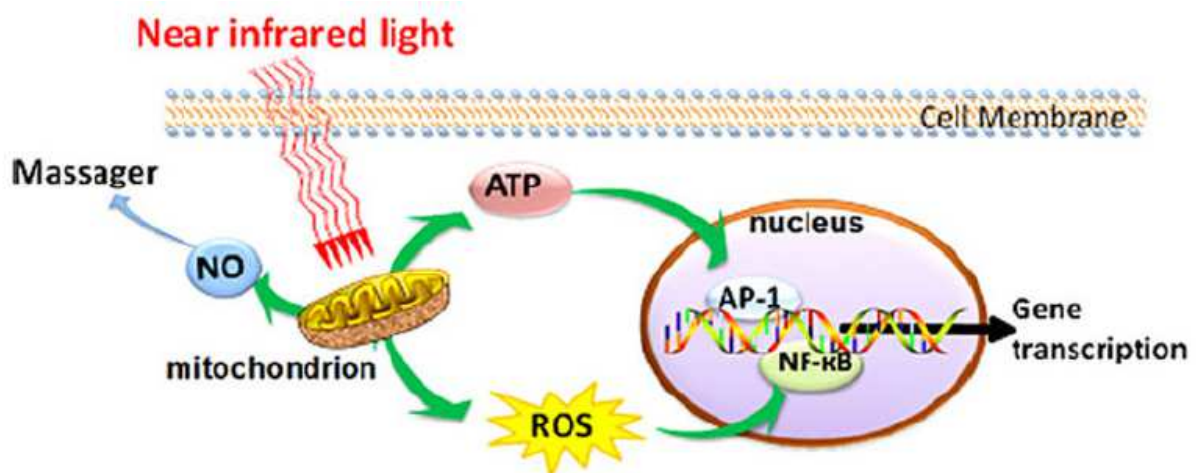
In der modernen Medizin findet die Lasertherapie eine breite klinische Anwendung in verschiedenen Bereichen. So werden beispielsweise high power Laser, wie CO<sub>2</sub>-, Argon- oder YAG-Laser in verschiedensten chirurgischen Disziplinen zur Evaporation (Verdampfung), Exzision und Koagulation von Gewebe genutzt (Roodenburg et al., 2002).

Im Gegensatz dazu wird eine energieärmere Low-Level-Lasertherapie als konservative Therapiemaßnahme bei verschiedenen Krankheitsbildern unterstützend angewendet. Der Begriff Low-Level-Laser bezeichnet dabei definitionsgemäß eine Strahlung im Bereich des infraroten Lichtes, die im Vergleich zu den chirurgischen Lasern nicht fähig ist, Gewebe zu erwärmen oder zu schneiden und deshalb auch als „cold laser“ Strahlung bezeichnet wird (Chung et al., 2012).

Die drei Hauptanwendungsgebiete dieser energieärmeren Lasertherapie begrenzen sich auf die Reduktion von Entzündungen, Förderung der Wundheilung und die Behandlung von Schmerzen bei neurologischen Krankheitsbildern. So wurde von Thomas ein supportiver Effekt bei kutanen Wundheilungsstörungen beobachtet (Thomas et al., 1995). Lampl et al demonstrierte, dass eine innerhalb von 24 Stunden nach ischämischem Schlaganfall durchgeführte Bestrahlung das neurologische Outcome der Patienten signifikant verbessern kann (Lampl et al., 2007). Für eine transkranielle Laserstimulation wurde sogar eine positive Beeinflussung von kognitivem und emotionalem Verhalten gezeigt (Barrett et al., 2013).

### 1.3. Einfluss der Laserstrahlung auf den zellulären Stoffwechsel

In mehreren *in-vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese Form der Laserstrahlung einen biostimulativen Effekt auf Mitochondrien ausübt (Greco et al., 1989). Dieser Effekt wird auch als Photobiomodulation bezeichnet, wobei die Stimulierung der Mitochondrien auf einer direkten Aktivierung von mitochondrialen Akzeptormolekülen, den Chromophoren, beruht (Sutherland, 2002). Hierzu wird auch Cytochrom C, ein Schlüsselenzym der mitochondrialen Atmungskette gezählt (Pastore et al., 1994). Der so gesteigerte zelluläre Metabolismus führt zu einer erhöhten Produktion von ATP (Adenosin-Triphosphat), Radiakalfängern wie ROS (Reactive Oxygen Species) und Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF-kB (für eine Übersicht siehe Abbildung 1) (Karu, 1999; Chen et al., 2011). Die erhöhte Proteinsynthese triggert weitere zelluläre Down-Stream Effekte wie erhöhte Zellmigration und Proliferation und beeinflusst die Ausschüttung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (Karu et al., 2005).



**Abbildung 1: Darstellung der Photobiomodulation (modifiziert nach Chung 2012)**

Abkürzungen: near infrared light = Frequenz nahe am Infrarotlicht, Cell Membrane = Zellmembran, mitochondrion = Mitochondrium, NO = Stickstoffmonoxid, ATP = Adenosin-Triphosphat, ROS = reactive oxygen species, nucleus = Zellkern, Gene transcription = Gentranskription, AP-1 und NF-kB = Transkriptionsfaktoren



## **1.4. Photodynamische Therapie (PDT)**

### **1.4.1. Wirkprinzip der PDT**

Bei der photodynamischen Therapie trifft Licht einer bestimmten Wellenlänge und Intensität auf einen vorher applizierten Photosensibilisator und führt zu dessen Aktivierung. Dies führt im Rahmen einer **photodynamischen Reaktion (PDR)** zur Bildung von Sauerstoffradikalen (Sibata et al., 2001). Die gebildeten Radikale, die im Durchschnitt eine Halbwertszeit von 40 Nanosekunden und eine Reichweite von 20 Nanometern haben (Sibata et al., 2001), führen zur Apoptose und Nekrose im umliegenden Gewebe (Oleinick et al., 2002; Igney et al., 2002).

### **1.4.2. Photosensibilisatoren**

Photosensibilisatoren sind Moleküle, die fähig sind Lichtenergie zu übertragen (Calzavara-Pinton et al., 2007). Für den klinischen Gebrauch sollten die verwendeten Substanzen folgende Eigenschaften haben: keine Toxizität bis zur Aktivierung, eine hohe Hydrophilie für eine einfache systemische Applikation, Aktivierung durch eine gebräuchliche Wellenlänge, möglichst hohe Konzentration im Tumorgewebe und ein niedriger Anschaffungspreis (Allison et al., 2013). Heutzutage haben sich folgende Stoffgruppen als Photosensibilisatoren auf dem Markt etabliert: Hämatoporphyrinderivate (Photofrin), M-Tetrahydroxyphenyl Chlorine (Foscan), Mono-L-Aspartyl Chlorine e6 (NP6), Aminolävulinsäure (ALA) und Fotosens (Allison and Moghissi, 2013).

### **1.4.3. Bestrahlung**

Jeder Photosensibilisator benötigt eine bestimmte Wellenlänge und Energiedosis für seine erfolgreiche Aktivierung (Kato, 1996). Generell werden für die Aktivierung von Photosensibilisatoren hohe Wellenlängen für tiefe Gewebeschichten und niedrige Wellenlängen für oberflächliche Zonen genutzt. So hat beispielsweise eine Wellenlänge von 630 nm eine Eindringtiefe von einem halben Zentimeter, im Gegensatz dazu besitzen Wellenlängen von 400 nm eine Eindringtiefe von nur einem Millimeter (Sibata et al., 2001; Brancalion et al., 2002). Die heute gängigen Präparate wie Aminolävulinsäure oder Hämatoporphyrinderivate können von einem breiten Wellenlängenspektrum angeregt werden. Weitere Einflussgrößen auf die

Wahl der korrekten Wellenlänge sind Tumorgröße und -tiefe sowie angrenzende anatomische Strukturen.

Im klinischen Alltag findet sich ein breit gefächertes Angebot an Bestrahlungsgeräten. Neben Lasern finden auch Diodenlampen (LED = light emitting diode) Verwendung. Um das Licht bei schwieriger topographischer Anatomie möglichst nahe an den gewünschten Ort der Aktivierung zu bringen, sind zahlreiche Möglichkeiten entwickelt worden. Neben der Implantation von fiberoptischen Kabeln in das Tumorgewebe sind auch ultraschall- oder computertomographisch gestützte Methoden beschrieben worden (Brancaleon and Moseley, 2002).

#### **1.4.4. Klinische Anwendung der PDT**

In der Dermatologie stellt die PDT eine vergleichsweise unkomplizierte und schonende Therapiemöglichkeit zur Behandlung oberflächlicher Hautveränderungen dar. Klinische Beispiele sind die aktinische Keratose, Morbus Bowen und das Basalzellkarzinom (Kostovic et al., 2012). Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind kutane Lymphome, virale Warzen, Psoriasis und Sklerodermie (Issa et al., 2010).

In der modernen Zahnheilkunde wird die PDT als antimikrobielle **Photodynamische Therapie** (aPDT) eingesetzt. Der lokal applizierte Photosensibilisator Phenothiazin-Chlorid lagert sich in die Zellmembran von Bakterien ein und wirkt nach Bestrahlung durch Sauerstoffradikalbildung toxisch (Schneider et al., 2012). Klinische Verwendung findet dies in der Therapie der Periimplantitis (Schar et al., 2013), der generalisierten Parodontitis (Novaes et al., 2012) und im Rahmen von Wurzelkanalbehandlungen bei Endodontitiden (Shrestha et al., 2012).

### **1.5. Zytostatika**

#### **1.5.1. Cisplatin**

##### **1.5.1.1. Indikationen**

Cisplatin ist ein weit verbreitetes Zytostatikum zur systemischen Behandlung verschiedener solider Tumoren. Chemisch gesehen handelt es sich hierbei um Diamindichloridoplatin. Erstmals wurde seine zytostatische Wirkung von Rosenberg an *Escherichia coli* Bakterien beschrieben (Rosenberg et al., 1965). Darauf

aufbauende Arbeiten konnten im Tiermodell erfolgreich einen therapeutischen Effekt bei Hodenkarzinomzellen beschreiben (Rosenberg et al., 1969).

Heute ist es ein fester Bestandteil in der Chemotherapie von Lungen- (Stathopoulos et al., 1999), Kopf-Hals- (Geiger et al., 2014), Gallenblasen- (Thissen et al., 2013) und Hodentumoren (Oliver et al., 1993). Speziell bei Hodentumoren werden dabei Heilungsraten von über 90% beschrieben (Rodenhuis et al., 1999).

Cisplatin wird meistens in Kombination mit anderen Zytostatika in der Erstlinien-Therapie verwendet, wobei auch adjuvante Konzepte nach operativer Behandlung oder Radiotherapie beschrieben sind (Basu et al., 2010).

#### **1.5.1.2. Wirkmechanismus**

Der planare cis-Platinkomplex (im Weiteren kurz Cisplatin), der von seiner chemischen Konfiguration betrachtet am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden gebunden hat, ist signifikant zytotoxischer als die Transkonfiguration (Zamble et al., 1995). Bei Cisplatin handelt es sich um eine so genannte Prodrug, welche erst biologisch aktiviert werden muss. Hierfür erfolgt nach zellulärer Aufnahme von Cisplatin eine Hydrolyse, die zur eigentlichen Aktivierung führt, indem die beiden Chloridliganden durch Wassermoleküle ersetzt werden. Begünstigt wird dies durch die niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration im Vergleich zu einer hohen extrazellulären Chloridkonzentration (Sedletska et al., 2005).

Die molekulare Wirkweise von Cisplatin beruht hauptsächlich auf einer direkten Bindung an die DNA (deoxyribonucleic acid) im Zellkern (Boulikas et al., 2003). Elektrophile Cisplatin-Komplexe bilden Addukte mit der DNA und zwar bevorzugt mit dem nukleophilen Stickstoffatom der DNA-Basen Adenin und Guanin. Daraus entstehen größtenteils Intrastrand-Addukte innerhalb des DNA-Strangs sowie zu einem geringen Prozentsatz Interstrand-Addukte zwischen den beiden DNA-Strängen. Es wird postuliert, dass die Zytotoxizität von Cisplatin hauptsächlich auf den Intrastrand-Addukten beruht (Reed et al., 1990). Folgen sind eine Verkürzung der DNA, Verzerrung der Sekundärstruktur, eine fehlerhafte Basenstapelung und eine Entwindung der Doppelhelix, was zu einem Verlust der thermischen DNA-Stabilität sowie zu einer fehlerhaften DNA-Replikation und –Transkription in der betroffenen Zelle führt (Wang et al., 2005).

Diese so entstandenen DNA-Schäden beeinflussen verschiedene zelluläre Signaltransduktionswege. Im Fokus stehen hierbei unter anderem die Kinasen AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue), c-ABL (v-abl Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1), MAPK (mitogen-activated protein kinase), ERK (extracellular signal-regulated kinase) und das Tumorsuppressorgen p53 (Wang and Lippard, 2005).

Über diese genannte zellulären Botensystem kommt es dann zu einer Induktion des Zelltodes (Sedletska et al., 2005), wobei die Art des Zelltodes abhängig von der Höhe der Cisplatinkonzentration zu sein scheint (Gonzalez et al., 2001). *In-vitro* wurde von Lieberthal et al gezeigt, dass hohe Cisplatinkonzentrationen (800 µmolar) zu einer Nekrose und geringe Cisplatinkonzentrationen (8 µmolar) zu einer Einleitung der Apoptose (programmierter Zelltod) führen (Lieberthal et al., 1996). Es wird vermutet, dass vorwiegend apoptotische Zelluntergänge ablaufen, wobei diese durch die Aktivierung von spezifischen Aspartatproteasen, insbesondere Caspase 8 und 9, ausgelöst werden (Gonzalez et al., 2001).

#### **1.5.1.3. Nebenwirkungen**

Die Therapie ist von zahlreichen oft schwerwiegenden und teils limitierenden Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Asthenie sowie Nephro-, Oto- und Neurotoxizität gekennzeichnet (Rosenberg, 1977; Hill et al., 1982). Eine Nierenprotektion kann durch eine ausreichende Hydratation sowie durch eine Kalium- und Magnesiumsubstitution erreicht werden. Gegen Übelkeit hat sich die Gabe von Serotoninrezeptorantagonisten bewährt (Wong et al., 1999). Jedoch ist die Neurotoxizität, die sich klinisch als periphere Neuropathie, Tinnitus oder Hochtonhörverlust äußern kann, der primär dosislimitierende Faktor dieser Zytostatikatherapie (Decatris et al., 2004).

#### **1.5.1.4. Resistenzentwicklung**

Die zunehmende Cisplatinresistenz von Tumorzellen lässt sich auf zwei verschiedene Formen der Resistenzbildung zurückführen: Hemmung der Cisplatinbindung an die DNA und Inhibition der Apoptoseinduktion.

Eine Möglichkeit, die Bindung von Cisplatin an die DNA zu unterbinden, sind reduzierte zelluläre Cisplatinkonzentrationen. Möglich wird dies durch eine

erschwerter zelluläre Aufnahme per Diffusion durch Einlagerung von Kollagen in die Zellmembran (Sherman-Baust et al., 2003). Ferner werden verschiedene Kupfer-Efflux-Transporter (ATP7A und ATP7B) mit erhöhten Cisplatin-Transportvorgängen in Verbindung gebracht (Samimi et al., 2004). Erhöhte Konzentrationen von thiolgruppenhaltiger Molekülen wie Glutathion in einer Zelle können zu einer gesteigerten Resistenz gegen Cisplatin durch ihre direkten antioxidativen Eigenschaften führen (Siddik, 2003).

Die zweite Methode der Resistenzentwicklung befasst sich mit Mutationen, die verhindern, dass Cisplatin-DNA-Addukte zur Apoptoseinduktion führen. Hier sind vor allem die verschiedenen DNA-Reparatursysteme zu nennen.

So wird zum Beispiel für das Nucleotide-Excision-Reparatursystem (NER), einer der wichtigsten Mechanismen zur Reparatur von Cisplatin-DNA-Addukten (Reed et al., 1990) angenommen, dass es durch bestimmte Glykosylasen zu einer Effizienzsteigerung der Reparatur mit verminderter Cisplatinempfindlichkeit kommt (Kartalou et al., 2001). Ähnliche Beobachtungen wurden für das Mismatch-Reparatursystem, verantwortlich für die Detektion und Reparatur von fehlerhaften Basenpaarungen, gemacht. Ein Funktionsverlust in diesem System führt zu einer erheblichen Resistenzsteigerung (Stojic et al., 2004).

Ebenfalls sind zahlreiche Mutationen im Apoptosesignalweg beschrieben worden, die ein Eintreten des programmierten Zelltodes verhindern können (Boulikas and Vougiouka, 2003). Eine zentrale Rolle nehmen dabei der c-fos / AP-1 Komplex, der Transkriptionsfaktor AP-2 sowie das Tumorsuppressorgen p53 ein (Dempke et al., 2000).

## **1.5.2. Zolendronsäure**

### **1.5.2.1. Indikationen**

Zolendronsäure wird pharmakologisch zu den Bisphosphonaten gerechnet. Klinische Anwendung findet diese Stoffgruppe bei verschiedensten Knochenerkrankungen wie Morbus Paget (Reid, 2012), postmenopausaler Osteoporose (Handler, 2008), dem multiplen Myelom (Kyle et al., 2004) und bei ossär metastasierten Karzinomen (Roodman, 2004).

Biochemisch handelt es sich bei Bisphosphonaten um Pyrophosphatanaloga, bei denen die P-O-P Bindung durch eine P-C-P Bindung ersetzt worden ist, welches das Molekül gegen chemische Hydrolyse durch Osteoklasten resistent werden lässt (Green, 2004). Die Seitenketten dieses zentralen C-Atoms (auch als R1 und R2 bezeichnet) stellen das eigentliche pharmakologische Charakteristikum dar und sind maßgeblich für die weitere Klassifizierung dieser Stoffgruppe verantwortlich. Man unterscheidet je nach Existenz von Stickstoff in der Seitenkette zwischen stickstoffhaltigen (Alendronate, Ibandronate und Zolendronate) und stickstofffreien (Clodronate, Tiludronate und Etidronate) Bisphosphonaten (Russell et al., 1999).

### **1.5.2.2. Wirkmechanismus**

Bisphosphonate zeichnen sich durch eine schlechte intestinale Resorption bei oraler Gabe aus. Die Resorptionsraten werden aufgrund der geringen Lipophilie zwischen 1% und 10% angegeben. Bei gleichzeitiger Kalziumaufnahme wird die intestinale Resorption weiter signifikant reduziert. Im Gegensatz dazu werden bei intravenöser Gabe ungefähr 70% des applizierten Bisphosphonates im Knochen gespeichert. Die Exkretion erfolgt hauptsächlich renal, wobei nahezu kein Metabolismus stattfindet (Lin, 1996).

Stickstofffreie Bisphosphonate werden von Osteoklasten zu zytotoxisch wirkenden Adenosintriphosphatanaloga metabolisiert (Frith et al., 2001). Außerdem wird eine Inhibierung von ATP-abhängigen intrazellulären Enzymen angenommen (Russell, 2006). Im Gegensatz dazu hemmen stickstoffhaltige Verbindungen die Bildung von verschiedenen Second Messengern wie Rhas, Rho und Rac über den Mevalonsäure-Zyklus durch Hemmung der Protein-Prenylierung (Green, 2004; Russell and Rogers, 1999).

Diese beschriebenen zellulären Wirkungen führen zur Aktivitätsminderung der Osteoklasten bis hin zur Apoptose. Ähnliche Beobachtungen sind *in-vitro* auch für Epithelzellen, Fibroblasten und auch Osteoblasten beschrieben worden (Basso et al., 2013). Da Bisphosphonate vorwiegend an Kalziumphosphat binden, sind besonders Osteoklasten betroffen. Dies führt zu einem reduzierten Knochenstoffwechsel mit einem verminderten Knochenabbau, einer erhöhten Mineralisation und einer Zunahme der Knochenmasse (Reszka et al., 2003).

Neben den beschriebenen Effekten auf den Knochenstoffwechsel zeichnen sich Bisphosphonate durch zahlreiche andere zelluläre Wirkweisen aus. Im Folgenden soll daher näher auf ihre anti-angiogenetische sowie anti-kanzerogene Wirkung eingegangen werden.

Experimentell konnte *in-vitro* und *in-vivo* eine Hemmung der Neoangiogenese durch eine verstärkte Apoptose der Endothelzellen mit einer reduzierten Kapillarbildung nachgewiesen werden (Caraglia et al., 2006).

In der aktuellen Literatur lassen sich zahlreiche Arbeiten finden, die einen antiproliferativen Einfluss für verschiedene Tumorentitäten diskutieren. So konnte Ural et al. für Mammakarzinomzellen eine direkte zytotoxische Wirkung von Zolendronsäure zeigen (Ural et al., 2006). Ähnliche *in-vitro* Resultate wurden für Prostatakarzinomzellen wie auch für Melanomzellen publiziert (Alcaraz et al., 2013). Auch für Knochenmarktumoren, wie der chronischen myeloischen Leukämie, zeigten Bisphosphonate in experimentellen Ansätzen eine direkte antiproliferative und zytotoxische Wirkung (Shipman et al., 1998).

### **1.5.2.3. Nebenwirkungen**

Bisphosphonate sind durch ein grundsätzlich günstiges Nebenwirkungsprofil gekennzeichnet. Bei oraler Gabe werden Oberbauchbeschwerden, Dyspepsie und Diarrhö bis hin zu Gastritiden und Ösophagitiden beschrieben. Eine intravenöse Gabe kann, meist nur nach der ersten Verabreichung, eine Akut-Phase-Reaktion mit Fieber und Leukozytose für 1-3 Tage auslösen (Anastasilakis et al., 2012). Bei einer Applikation von 200-300 mg sind Fälle von akutem Nierenversagen beschrieben worden. Selten werden ophthalmologische Begleiterscheinungen wie Phlebitis, Uveitis und Skleritis beobachtet (Adami et al., 1996).

Eine der Hauptnebenwirkungen ist die Bisphosphonat-assoziierte Nekrose des Kiefers, in der englischsprachigen Literatur auch als BONJ (Bisphosphonat related osteonekrosis of the jaw) bezeichnet. Laut der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons wurden folgende Diagnosekriterien definiert: laufende oder frühere Behandlung mit Bisphosphonaten, über acht Wochen persistierend freiliegender Knochen (*Os librum*) im Kieferbereich und keine vorangegangene Radiatio (Reid, 2009). Symptome sind Entzündungen in Kombination mit *Foetor ex ore*, Weichteilschwellung, Schmerzen, Zahnverlust bis hin zu Frakturen meist in

Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Zahnextraktion. Das Os librum zeichnet sich durch eine Exsudation mit fehlender Blutungsneigung und Sequesterbildung aus. Weiterhin werden Dysästhesien oder Anästhesien im Innervationsgebiet der Trigeminusäste Nervus mandibularis und maxillaris beschrieben. Bei besonders schweren Fällen mit protrahiertem Verlauf kann es zur extraoralen Fistelbildung kommen (Migliorati et al., 2005).

Der zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass eine direkte Knochentoxizität, ein reduzierter Knochenstoffwechsel sowie ein gestörtes Remodelling dafür verantwortlich sein könnten (Reid, 2009; Hoff et al., 2008).

## **1.6. Fragestellung dieser Arbeit**

Es ist relativ unklar, in welcher Art und Weise eine Bestrahlung in Form einer Low-Level-Lasertherapie die Bioviabilität von Zellen unter Zytostatikatherapie beeinflusst. Einige klinische Studien beschreiben sowohl einen protektiven als auch einen kurativen Effekt für Patienten mit oraler Mukositis, einer häufig auftretenden Nebenwirkung einer Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren. Unter Lasertherapie wird eine signifikante Reduktion von Schmerzen, Schluckstörungen und Analgetikaverbrauch beobachtet (Gautam et al., 2012; Gautam et al., 2013). Dies könnte die Rate an Therapieabbrüchen senken (Gouvea de Lima et al., 2012). Übereinstimmung findet dies mit den *in-vitro* Versuchen von Bayram et al. Er beobachtete, dass bei einer Inkubation von Knochentumorzellen mit Zolendronsäure die Bioviabilität durch eine gleichzeitige Laserbestrahlung im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert wird (Bayram et al., 2013).

Im Gegensatz dazu wurde für die Bestrahlung im Sinne einer Photodynamischen Therapie mit dem Photosensibilisator Photogem *in-vitro* bei Kolonkarzinomzellen eine Toxizitätssteigerung von Cisplatin beobachtet (Ge et al., 2011). Ebenfalls *in-vitro* zeigte sich bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen ein synergistischer Effekt der Cisplatinwirkung und der Photodynamischen Therapie (unter Verwendung von Radachlorin als Photosensibilisator) (Biswas et al., 2013).

Auch wurde für eine alleinige Laserbestrahlung sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eine Toxizitätszunahme von Cisplatin bei Hypopharynxkarzinomzellen beschrieben



(Chung et al., 2003). Bestätigung finden diese Ergebnisse in den *in-vivo* Untersuchungen von Kanekal (Kanekal et al., 2009) und Paiva (Paiva et al., 1998). Ziel dieser Arbeit ist es daher, *in-vitro* den Effekt einer Low-Level-Laserbestrahlung auf den Zellstoffwechsel von humanen primären Fibroblasten und Kopf-Hals-Tumorzellen (HNSCC-UM-3 Zellen) unter Zolendronsäure oder Cisplatintherapie zu untersuchen. Hieraus könnten neue therapeutische Ansätze für die Behandlung von Tumoren und Zysten im Kopf-Hals-Bereich analog zu einer Photodynamischen Therapie entwickeln werden.

## 2. Kapitel: Material und Methodik

### 2.1. Versuchsaufbau

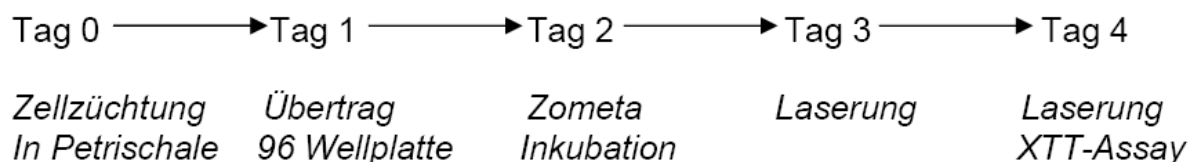
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet: zum einen primäre humane Fibroblasten und zum anderen eine Plattenepithelkarzinomzelle eines Kopf-Hals-Tumors (head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC). Es handelt sich hierbei ursprünglich um Gewebe einer Lymphknotenmetastase eines Plattenepithelkarzinoms der Columella (HNSCC-UM-3) (Krause et al., 1981). Zur Bestätigung der Identität wurde eine Genotypisierung durchgeführt und mit dem Standardgenotyp verglichen (Zhao et al., 2011).

Um Kontaminationen der Zellkulturen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten im Sterilflur (Terralin, Schülke und Mayer, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt sowie alle Materialien vor dem Einsatz gereinigt bzw. desinfiziert / sterilisiert.

Jede Zelllinie wurde in Petrischalen (100 x 20 mm, Sarstedt, Newton, USA) bis zu einer Konfluenz von circa 70-80% gezüchtet. Es wurden immortalisierte HNSCC-UM-3 Zellen verwendet sowie ausschließlich Fibroblasten der Passage 3-4. Für den Versuch wurden die Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen pro Well in eine 96-well Platte (REF 83.3924, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) übertragen. Hierfür wurde zur Zellpassage das Medium entfernt und der Zellrasen anschließend mit 37 °C warmem Phosphatpuffer (Phosphate buffered Saline (PBS) 10 mM, pH 7.4, Gibco-Lifetechnologies Ltd., Paisley, UK) gespült. Danach wurden die Zellen für 15 min mit 25 °C warmer Trypsinlösung (Trypsin-EDTA, PAA Laboratories, Pasching Österreich) inkubiert. Die trypsinisierten Zellen wurden in 3 ml Medium aufgenommen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend resuspendiert. Nach Einstellen der korrekten Zellzahl mittels der Volkmann-Zählkammer wurden die Zellen dann auf die 96-well Platte transferiert. Nach 24 stündiger Inkubation mit dem entsprechenden Medium wurde den Zellen Zolendronsäure (Zometa, Novartis AG, Basel, Schweiz, 4mg/5ml) in den Konzentrationen 50, 100 und 200 µmolar oder Cisplatin (Cis-Diamminedichloroplatinum(II), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) nach vorheriger Lösung in PBS in den Konzentrationen 1.56, 3.25, 6.5,

13 und 26  $\mu\text{molar}$  hinzugefügt. Wells ohne das jeweilige Zytostatikum dienten als Kontrollgruppen. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in den Wells mit einem 670 nm Diodenlaser (Helbo Photodynamic Systems, Bredent Medical GmbH & Co KG, Walldorf, Österreich) kontinuierlich für 2 Minuten mit einer Energie von  $100\text{mW} / \text{cm}^2$  (unter Verwendung der dazu kompatiblen 2D Spot Probenaufsätze) bestrahlt. Auch hier wurden wieder unbestrahlte Gruppen als Vergleichsgruppe gebildet. Um für diesen Zeitraum die Einhaltung des korrekten Abstandes von Laser zur Welloberfläche von einem Zentimeter zu gewährleisten wurde eine Haltevorrichtung verwendet. Nicht bestrahlte Wells wurden mit Alufolie abgedeckt. Nach weiteren 24 Stunden wurde erneute eine Bestrahlung wie bereits beschrieben durchgeführt. Um Kontaminationen auszuschließen wurden die Zellen in dem Sterilflur bestrahlt.

Drei Stunden nach der letzten Bestrahlung wurde eine XTT-Messung zur Messung der Bioviabilität oder eine H.E.-Färbung für die sich daran anschließende histologische Untersuchung durchgeführt. Für die jeweilige Zelllinie (Fibroblast oder HNSCC Zelle), das jeweilige Zytostatikum (Cisplatin oder Zolendronsäure) und die jeweilige Untersuchung (XTT-Messung oder Histologie) wurden jeweils drei verschiedene Versuche angesetzt (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Darstellung des Versuchsaufbaues**

## 2.2. Zellkultur

Primäre humane Fibroblasten wurden von der Firma Promocell bezogen (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer C-12300). Es handelt sich hierbei um eine Isolation von Fibroblasten aus menschlicher Vorhaut. Die Zellen wurden bei 5 %  $\text{CO}_2$  und 37 °C im Inkubator gezüchtet und das laut Hersteller empfohlene Serum Fibroblast Growth medium kit (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer C-23110) verwendet. Die immortalisierten UM-SCC-3 Zelllinien

wurden unter gleichen Bedingungen in Kultur gehalten und als Medium DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium, Gibco brand Invitrogen Inc., Carlsbad, USA) versetzt mit 5 prozentigem fetalem Kälberserum (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) verwendet.

### **2.2.1. Einstellung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer**

In die Zählkammer wurde 10 µl Zellsuspension pipettiert, wobei aufgrund von Kapillarkräften die Suspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammer gezogen wurde. Die Kammer besteht aus neun großen Quadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,1 mm. Dies ergibt folglich ein Volumen von jeweils 0,1 µl pro Quadrat. Bei einer 100fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop (Axiovert 25 der Firma Zeiss, Jena, Deutschland) werden nun mindestens vier der neun großen Quadrate ausgezählt. Um Doppelzählungen der Zellen auf den Trennlinien zu vermeiden, wurden nur Zellen mitgezählt, die oben und links auf den Linien der Quadrate liegen. Der Mittelwert der gezählten Zellen x 10<sup>4</sup> ergab die Zellkonzentration pro Milliliter. Für einen Versuchsansatz wurden jeweils 600.000 Zellen in 12 Milliliter des entsprechenden Mediums verwendet.

### **2.2.2. Einfrieren der Zellen**

Die Zellen wurden entsprechend dem Vorgehen beim Passagieren von der Kulturschale gelöst und bei 2000 Umdrehungen pro Minute für 7 Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0R der Firma Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml DMEM resuspendiert und in ein Cryo Tube<sup>TM</sup> Vial der Firma Nunc A/S (Roskilde, Dänemark) überführt. Unmittelbar vor dem Einfrieren wurden 0,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt und untergemischt. Der Einfrierprozess erfolgte stufenweise von -20 °C auf -80 °C. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt.

### **2.2.3. Auftauen der Zellen**

In eine Petrischale wurden 10 ml Medium pipettiert. Danach wurde das entsprechende Cryo Tube<sup>TM</sup> Vial mit den Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach vollständigem

Auftauen wurden die Zellen in eine Petrischale überführt. Um das DMSO komplett zu entfernen, fand am nächsten Tag ein erneuter Mediumwechsel statt.

## 2.3. XTT-Messung

### 2.3.1. Prinzip

Es handelt sich hierbei um einen Zytotoxizitätstest zur nichtradioaktiven Quantifizierung der Zellproliferation und Bioviabilität. Das in den Mitochondrien lokalisierte Enzym Dehydrogenase wandelt das gelbe Tetrazoliumsalz (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) in den orange-violetten Farbstoff Formazan um (siehe Abbildung 3). Dieser ist wasserlöslich und kann mit Hilfe eines ELISA-Readers quantifiziert werden. Da oben genanntes Enzym nur in vitalen Zellen aktiv ist, kann durch die Menge an gebildetem Formazan indirekt auf die Vitalität der Zellen sowie die Zellzahl geschlossen werden. Inkubiert man Zellen mit steigenden Konzentrationen eines Zytostatikums, nimmt die Zahl der Zellen ab und es wird weniger Formazan gebildet (Scudiero et al., 1988).

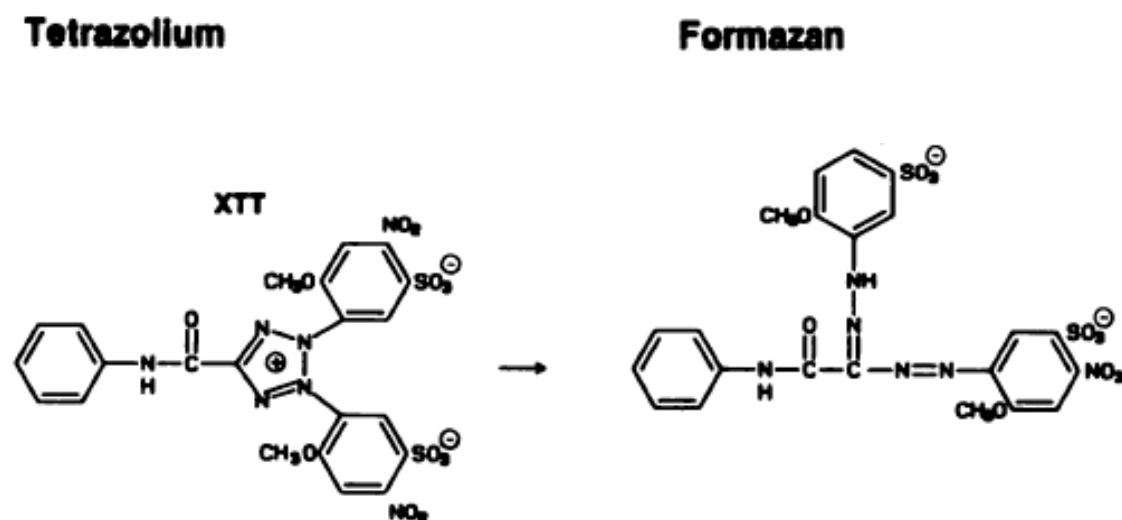


Abbildung 3: Strukturformeln von Tetrazolium und Formazan (modifiziert nach Scudiero 1988)

### 2.3.2. Durchführung

Es wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Durchführung des Assays erfolgte an Tag

vier. Entsprechend der Herstellerangaben wurden 50 µl des XTT-Reagenz und 1 µl Electron-coupling reagent in jedes Well pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation wurde die Messung im Microreader (DTX 880, multimode detector, Beckman Counter, Naumburg, Deutschland) mit Hilfe der zugehörigen Beckman Counter Multimode Analyse Software durchgeführt. Die Messung der Absorption fand bei einer Wellenlänge von 492 nm statt. Die Wellenlänge zur Messung der Hintergrundabsorption betrug 750 nm. Dreifachansätze wurden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

## **2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)**

Für die morphologische Analyse wurde der gleiche Versuchsaufbau wie für die XTT-Messung gewählt und eine H.E.-Färbung der 96-well Platte durchgeführt. Nach einer zweiminütigen Spülung mit PBS Puffer wurden die Zellen mit Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und mit 70-prozentigem Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gespült. Anschließend wurde eine H.E.-Färbung (Mayers Häkalaunlösung und Eosin, beide Substanzen von Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und die Platte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% - 90% - 100%) entwässert.

Um den Effekt einer Zytostatikatherapie mittels Cisplatin oder Zolendronsäure in Kombination mit einer Bestrahlung auf die Zelle morphologisch untersuchen zu können, wurden die gefärbten 96-well Platten unter dem Mikroskop (Zeiss AxioVert 135 Mikroskope mit AxioCam MRc5, Oberkochen, Deutschland) betrachtet und Übersichtsaufnahmen angefertigt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software nach morphologischen Gesichtspunkten (AxioVision Software, Zeiss Inc., Oberkochen, Deutschland).

## **2.5. Statistische Auswertung**

Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Software IBM SPSS Statistics Version 22.0 (SPSS GmbH, München, Deutschland). Erster Schritt der Auswertung war die Prüfung auf Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnow-Test. Um gleiche Varianz sicherzustellen, setzten wir den Levene-Median-

Test ein. Anschließend wurde ein T-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  festgelegt. Die graphische Aufarbeitung erfolgte ebenfalls mit SPSS Statistics Version 22.0. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation = SD) angegeben.

## **3. Kapitel: Ergebnisse**

### **3.1. XTT-Messung**

#### **3.1.1. Zytostatikatherapie**

Die höchsten Cisplatinkonzentrationen, 13 und 26  $\mu$ molar, reduzierten die Bioviabilität von Fibroblasten signifikant im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (für beide Gruppen  $p = 0.006$ ). Cisplatinkonzentrationen von 1,56, 3,25 bzw. 6,5  $\mu$ molar hatten keinen statistisch messbaren Einfluss ( $p = 0,989$  bzw.  $0,350$  bzw.  $0,150$ ) auf die Bioviabilität (Abbildung 4). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Inkubation mit Zolendronsäure. Konzentrationen von 100 und 200  $\mu$ molar führten zu einer signifikanten Senkung der Bioviabilität von Fibroblasten ( $p = 0,010$  und  $p = 0,012$ ). Eine Inkubation mit 50  $\mu$ molar Zolendronsäure zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,221$ ) (Abbildung 5).

Cisplatin entwickelte von 3,25 bis 26  $\mu$ molar eine signifikante Zytotoxizität für HNSCC-UM-3 Zellen (für alle  $p < 0,001$ ). Die Inkubation mit der geringsten Cisplatinkonzentration (1,56  $\mu$ molar) hatte keinen messbaren Einfluss ( $p = 0,455$ ) (Abbildung 4). Die Inkubation mit Zolendronsäure zeigte bei keiner Konzentration einen statistisch messbaren Effekt auf die Zellfunktion dieser Tumorzelllinie ( $p = 0,215$  für 50  $\mu$ molar,  $p = 0,345$  für 100  $\mu$ molar und  $p = 0,137$  für 200  $\mu$ molar) (Abbildung 5).

#### **3.1.2. Lasertherapie**

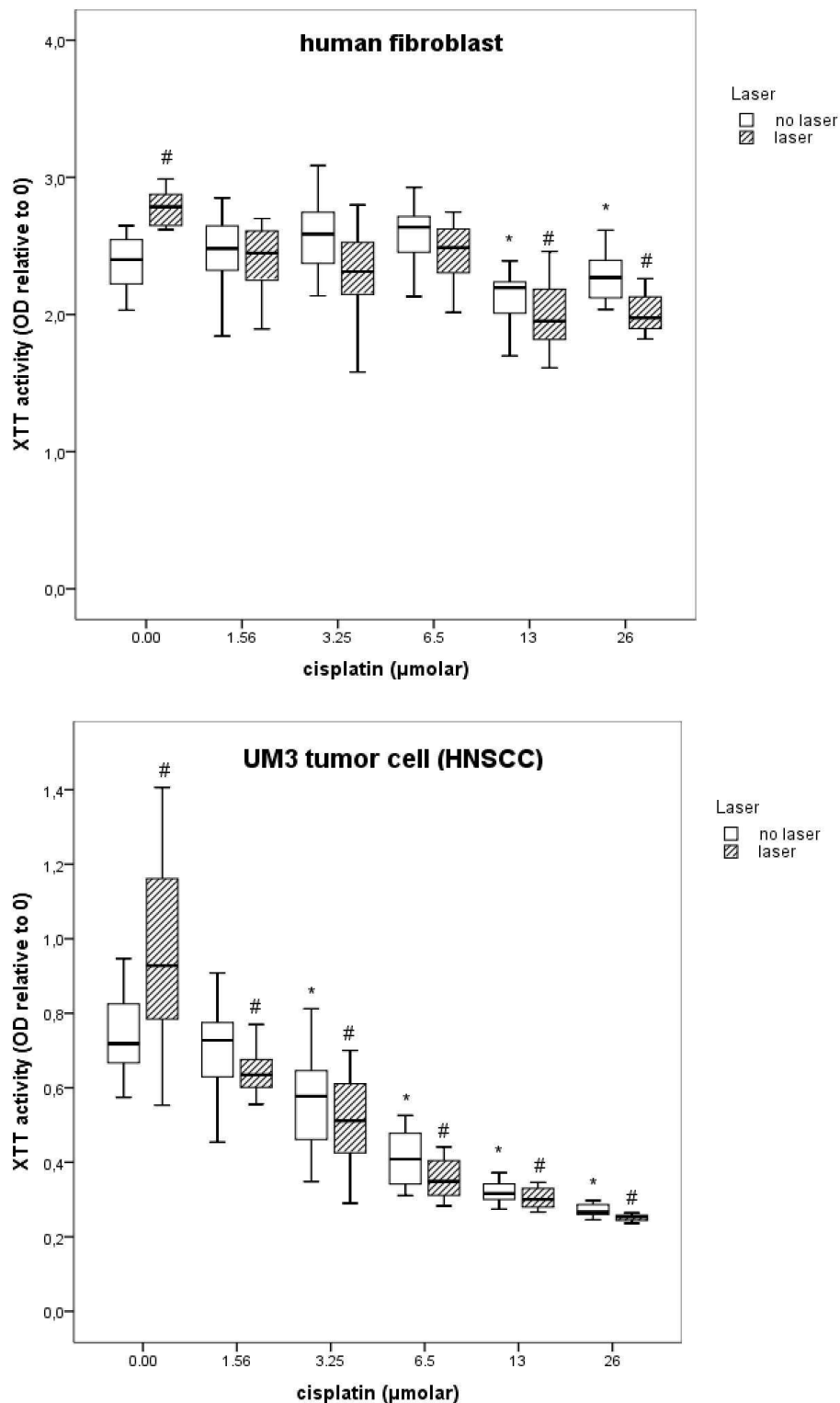
Eine alleinige Laserbestrahlung führte bei beiden Zelllinien zu einer deutlichen Zunahme der Bioviabilität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (für beide  $p < 0,01$ ) (Abbildung 4 und 5).

Bei einer gleichzeitigen Inkubation von Fibroblasten mit Cisplatin führte eine Bestrahlung bei den höchsten Konzentrationen (13 und 26  $\mu$ molar) zu einer signifikanten Steigerung der Zytotoxizität von Cisplatin im Vergleich zu einer alleinigen Cisplatininkubation der jeweiligen Konzentration ( $p = 0,027$  und  $p = 0,005$ ). Bei einer simultanen Bestrahlung mit niedrigeren Cisplatinkonzentrationen zeigten sich keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 4). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich



bei Zolendronsäure. Auch hier wurde eine statistisch messbare Toxizitätssteigerung für Fibroblasten bei 100 und 200  $\mu$ molar beobachtet (für beide  $p < 0,001$ ). Bestrahlungen bei 50  $\mu$ molar waren statistisch betrachtet nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 5).

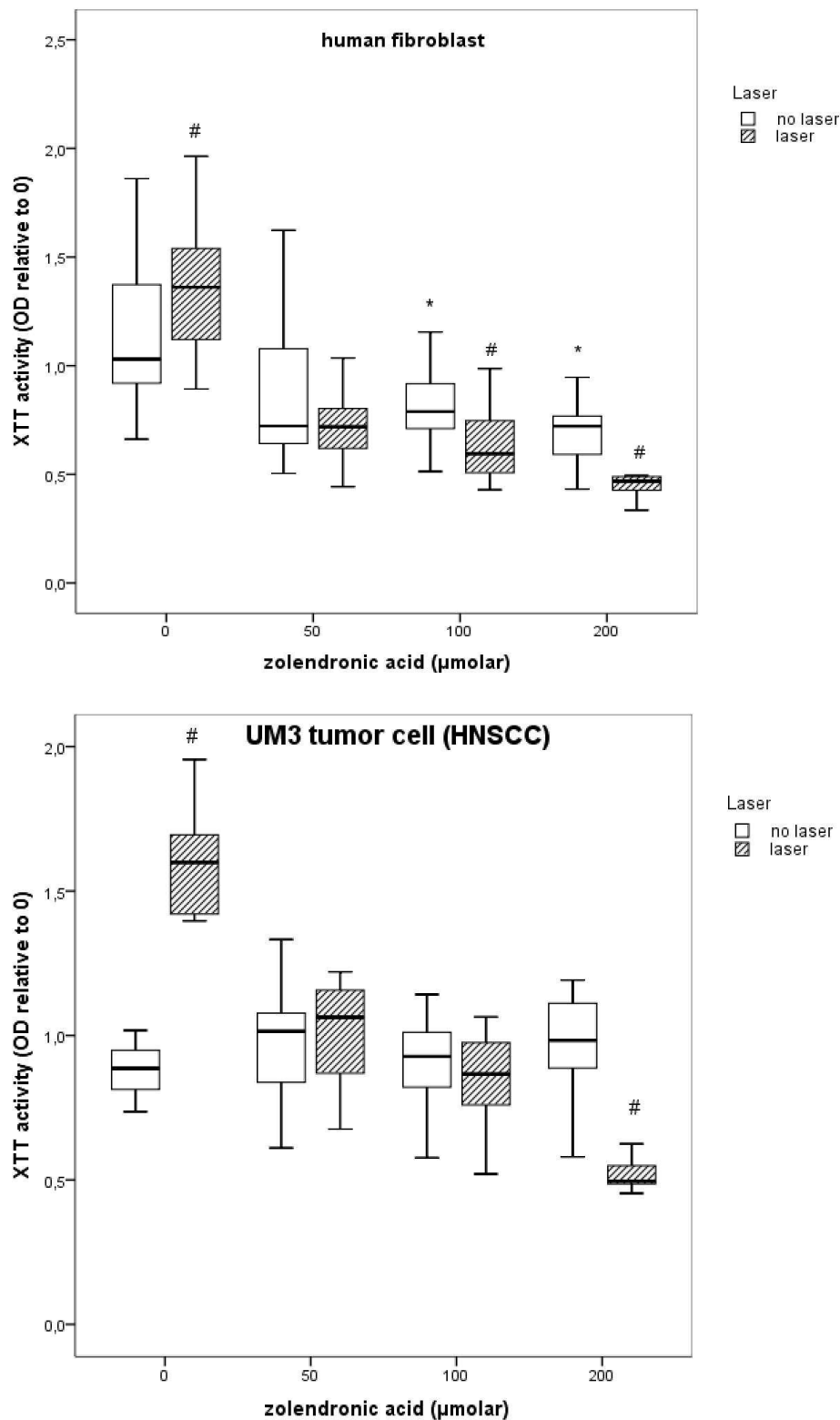
Für HNSCC-UM-3 Tumorzellen war bei jeder verwendeten Cisplatinkonzentration eine signifikante Toxizitätssteigerung durch Laserbestrahlung zu erkennen (für 1,56  $\mu$ molar  $p = 0,014$ , für 3,25  $\mu$ molar  $p = 0,032$ , für 6,5  $\mu$ molar  $p = 0,004$ , für 13  $\mu$ molar  $p = 0,008$  und bei 26  $\mu$ molar  $p = 0,002$ ) (Abbildung 4). Im Vergleich dazu wurde dieser Effekt nur bei der höchsten Zolendronsäurekonzentration (200  $\mu$ molar) beobachtet ( $p = 0,001$ ). Eine gleichzeitige Radiatio bei 50 und 100  $\mu$ molar führte zu keiner Zunahme der Zytotoxizität von Zolendronsäure ( $p > 0,05$ ) (Abbildung 5).



**Abbildung 4: XTT-Messung unter Cisplatininkubation**

Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Cisplatinkonzentration zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Eine Raute (#) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserbehandlung zur unbestrahlten Kontrollgruppe.



**Abbildung 5: XTT-Messung unter Zolendronsäureinkubation**

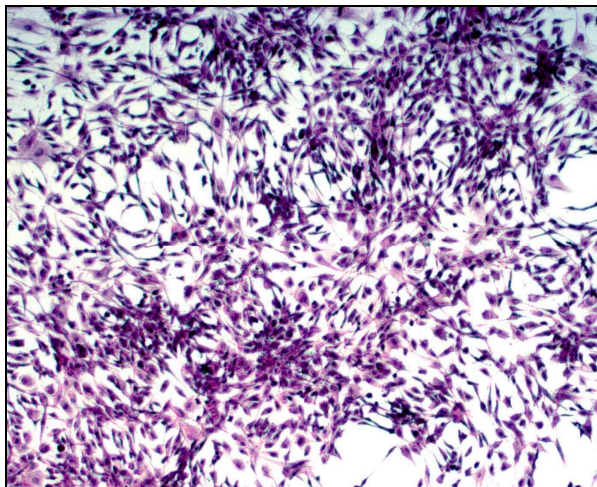
Ein Stern (\*) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Zolendronsäurekonzentration zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Eine Raute (#) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserbehandlung zur unbestrahlten Kontrollgruppe.

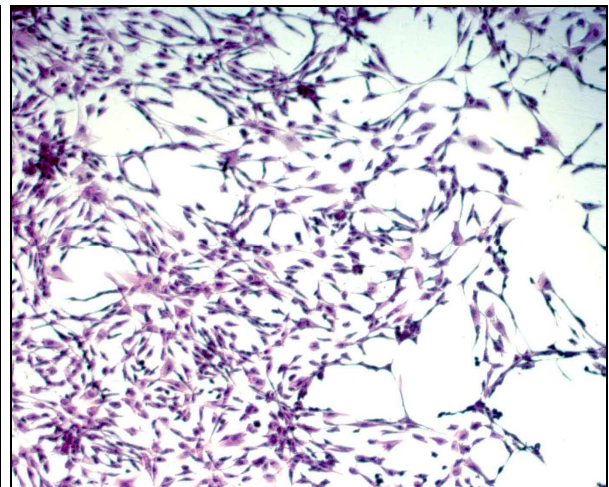
## 3.2. Histologie

### 3.2.1. Zytostatikatherapie

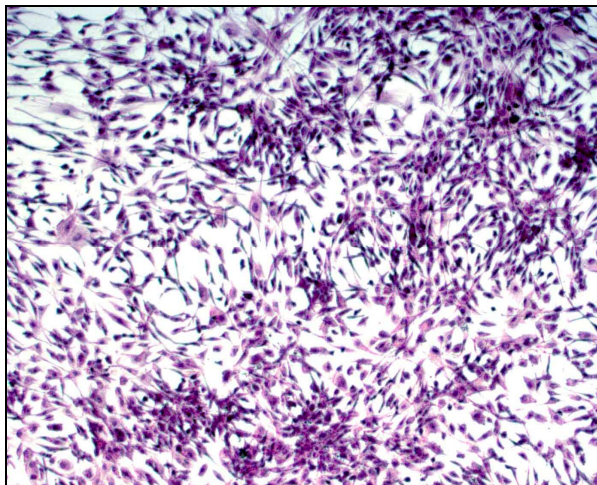
Bei humanen Fibroblasten ließ sich bei einer Inkubation mit 13  $\mu$ molar und 26  $\mu$ molar Cisplatin eine Verminderung der Zellzahl sowie eine veränderte Zellmorphologie im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6B für 13  $\mu$ molar) beobachten. Die Zellen wurden zum einen deutlich dünner und zeigten vergrößerte Nuklei. Dies zeigte sich auch bei Zolendronsäureinkubationen mit 100 und 200  $\mu$ molar (siehe Abbildung 6D für 100  $\mu$ molar).



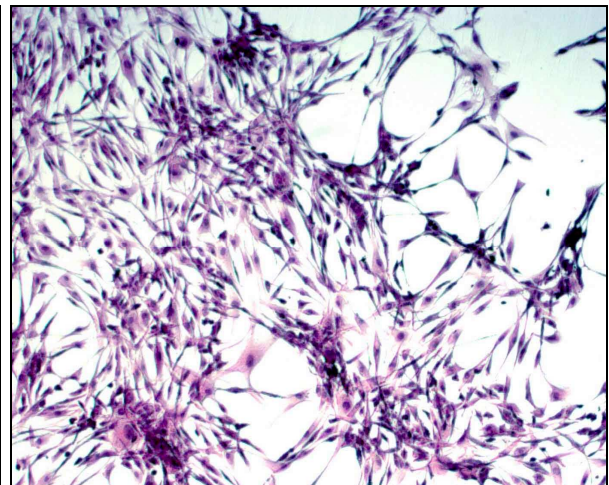
6A) Kontrollgruppe: ohne Cisplatininkubation  
ohne LLLT



6B) Kontrollgruppe: 13  $\mu$ molar Cisplatin ohne LLLT



6C) Kontrollgruppe: ohne Zolendronsäureinkubation ohne LLLT



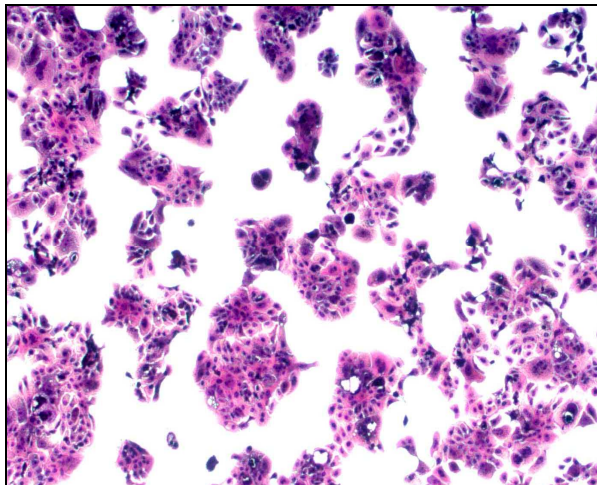
6D) Kontrollgruppe: 100  $\mu$ molar Zolendronsäureinkubation ohne LLLT

### Abbildung 6: Histologische Untersuchung von Fibroblasten

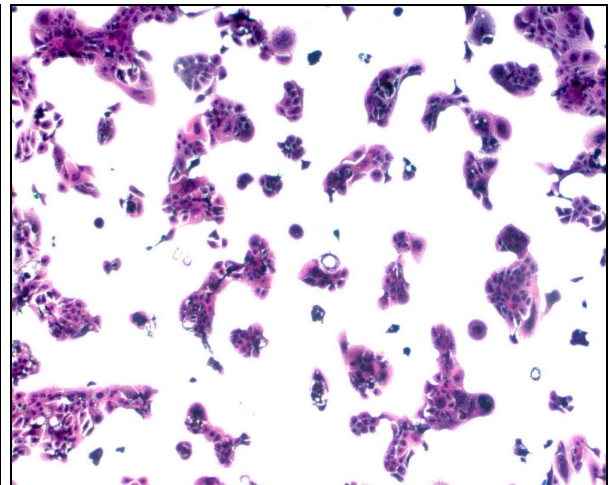
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung



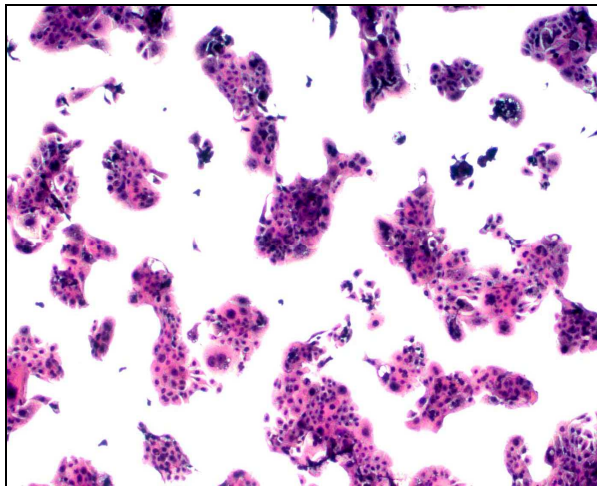
Ähnliche histologische Ergebnisse fanden sich bei der Analyse der HNSCC-UM-3 Zelllinie unter Cisplatininkubation. Hier wurden eine dosisabhängige Steigerung des Zellschadens und eine Verminderung der Zellzahl bei Konzentrationen von 3,25 bis 26  $\mu$ molar beobachtet (siehe Abbildung 7B für 3,25  $\mu$ molar). Konträr dazu konnten bei alleiniger Zolendronsäureexposition bei keiner Konzentration histologische Veränderungen detektiert werden (z. B. Abbildung 7D mit 200  $\mu$ molar Zolendronsäure).



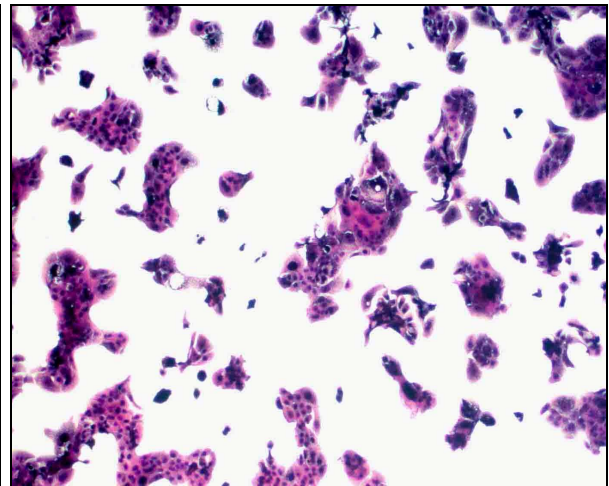
7A) Kontrollgruppe: ohne Cisplatininkubation  
ohne LLLT



7B) Kontrollgruppe: 3,25  $\mu$ molar Cisplatin ohne  
LLLT



7C) Kontrollgruppe: ohne Zolendronsäureinku-  
bation ohne LLLT



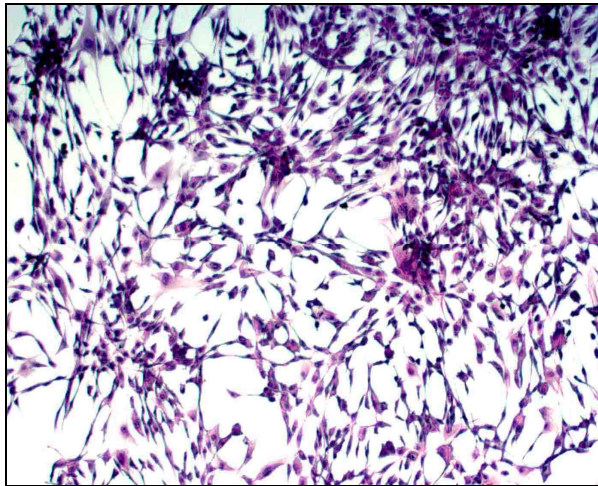
7D) Kontrollgruppe: 200  $\mu$ molar Zolendronsäurein-  
kubation ohne LLLT

### **Abbildung 7: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3**

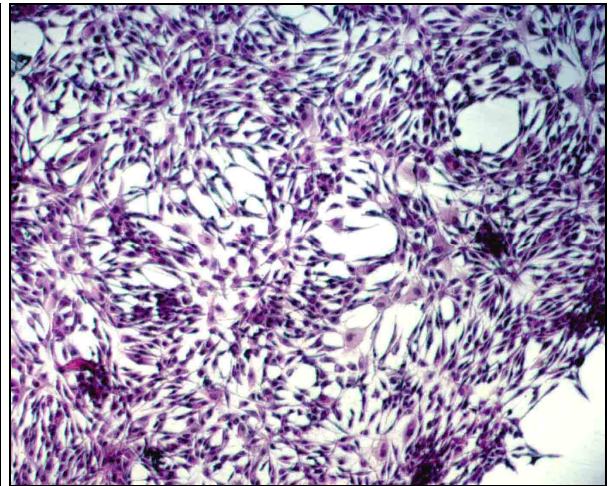
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung

### 3.2.2. Lasertherapie

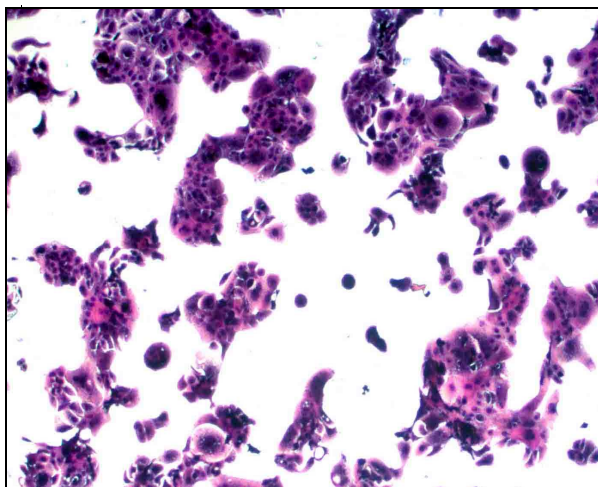
Eine alleinige Radiatio führte zu keiner histomorphologischen Veränderung der jeweiligen Zelllinie im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe (Abbildung 8B für bestrahlte Fibroblasten und Abbildung 8D für bestrahlte HNSCC-UM-3 Tumorzellen).



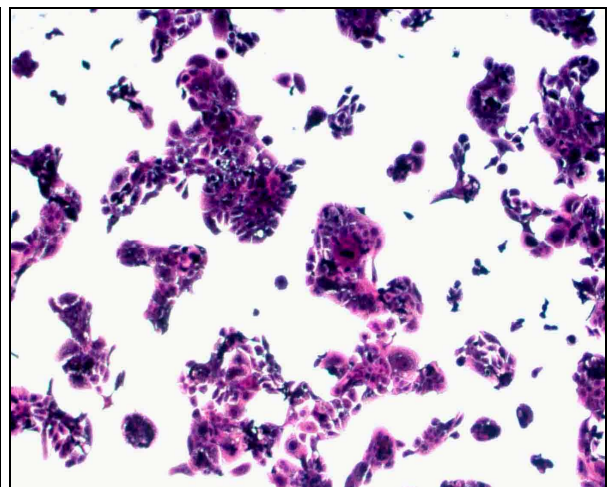
8A) Kontrollgruppe: keine Zolendronsäure-inkubation ohne LLLT



8B) Kontrollgruppe-Laser: keine Zolendronsäureinkubation mit LLLT



8C) Kontrollgruppe (HNSCC-UM-3): keine Cisplatininkubation ohne LLLT



8D) Kontrollgruppe-Laser (HNSCC-UM-3): keine Cisplatininkubation mit LLLT

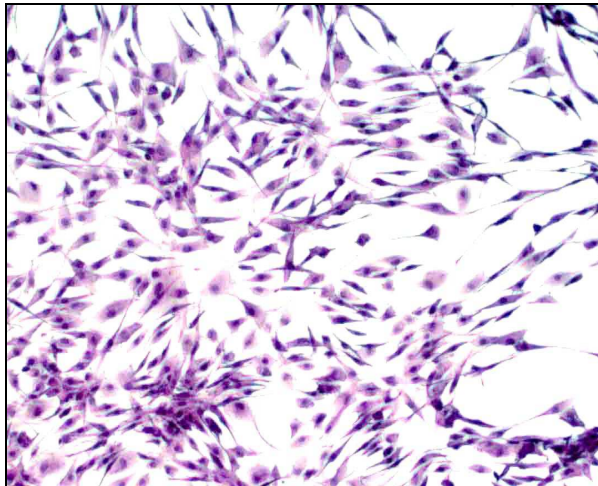
### Abbildung 8: Histologische Untersuchung von Fibroblasten und HNSCC-UM-3 Tumorzellen

H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung

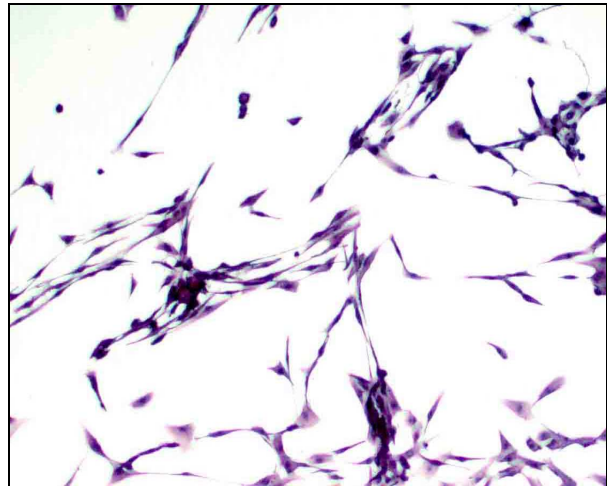
Der in der XTT-Messung bei Fibroblasten beobachtete zytotoxizitätssteigernde Effekt durch eine Radiatio zeigte sich auch histologisch bei den höchsten



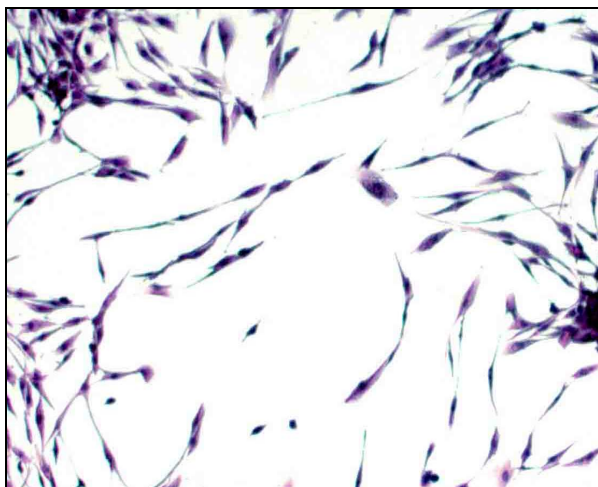
Cisplatinkonzentrationen (13 und 26  $\mu$ molar). Es kam zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl mit einer Zunahme von Apoptosezeichen (Abbildung 9B und 9D). Dieses Bild zeigt sich ebenfalls bei Inkubation mit 100 und 200  $\mu$ molarer Zolendronsäure mit nachfolgender Low-Level-Lasertherapie (Abbildung 10B und 10D).



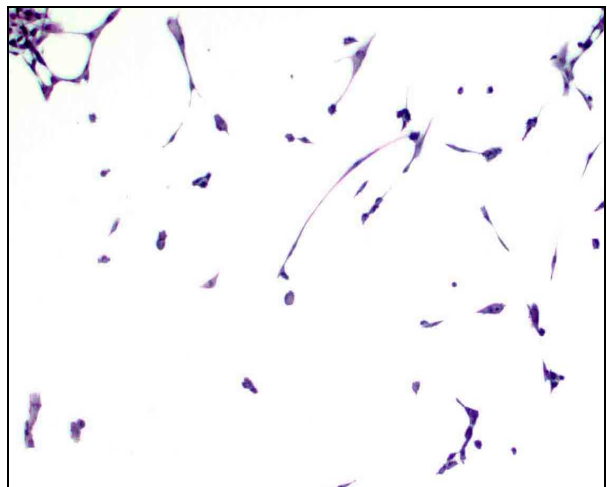
9A) 13  $\mu$ molar Cisplatin ohne LLLT



9B) 13  $\mu$ molar Cisplatin mit LLLT



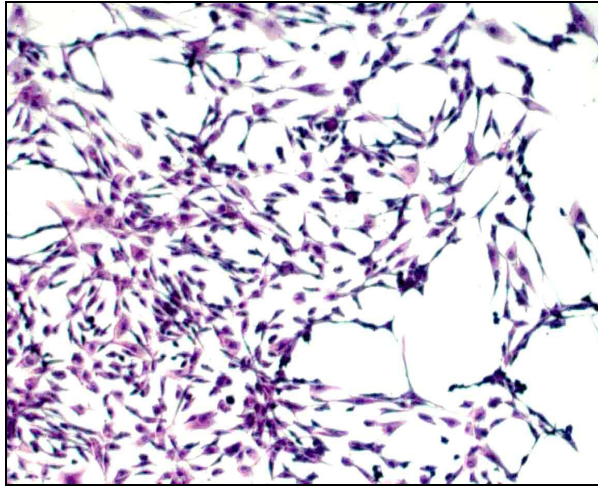
9C) 26  $\mu$ molar Cisplatin ohne LLLT



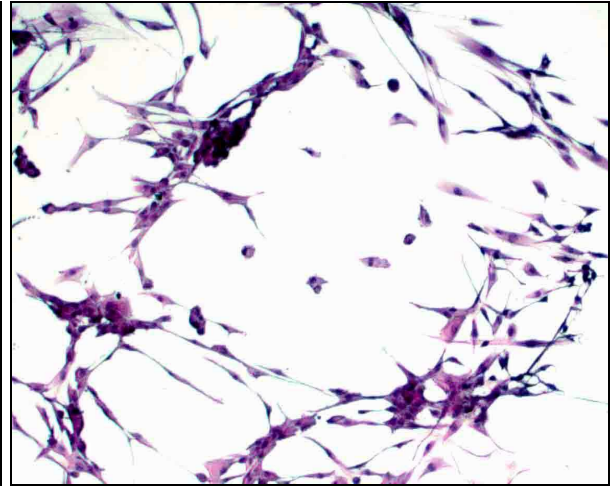
9D) 26  $\mu$ molar Cisplatin mit LLLT

### **Abbildung 9: Histologische Untersuchung von Fibroblasten**

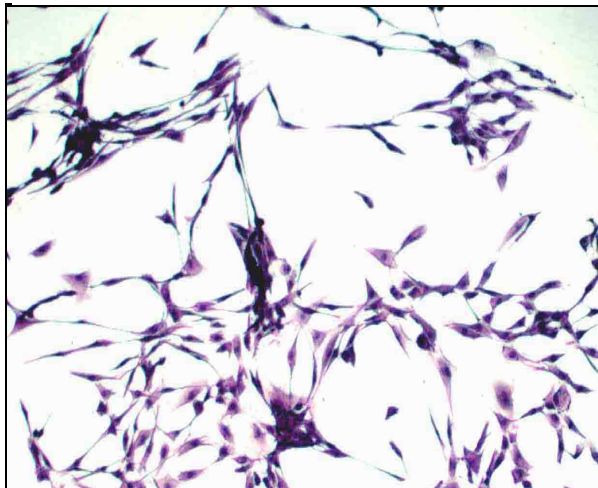
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung



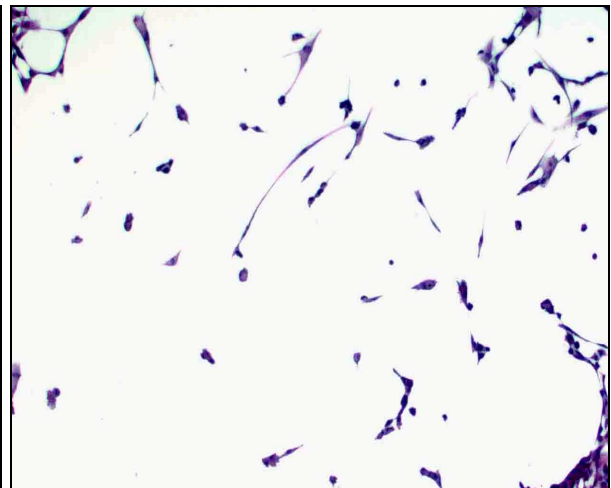
10A) 100 µmolar Zolendronsäure ohne LLLT



10B) 100 µmolar Zolendronsäure mit LLLT



10C) Fibroblasten: 200 µmolar Zolendronsäure  
ohne LLLT



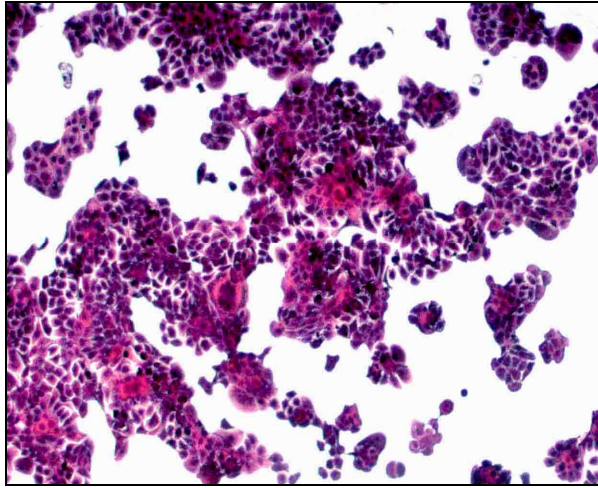
10D) Fibroblasten: 200 µmolar Zolendronsäure  
mit LLLT

### **Abbildung 10: Histologische Untersuchung von Fibroblasten**

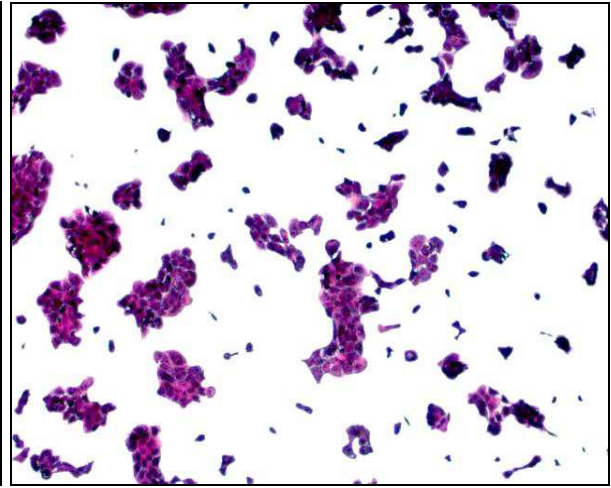
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung

Bei der histologischen Auswertung der HNSCC-UM-3 Zelllinien waren bei jeder Cisplatinkonzentration unter Low-Level-Lasertherapie Zeichen der Toxizitätssteigerung zu sehen (Abbildungen 11B, 11D, 11F, 12B und 12D).

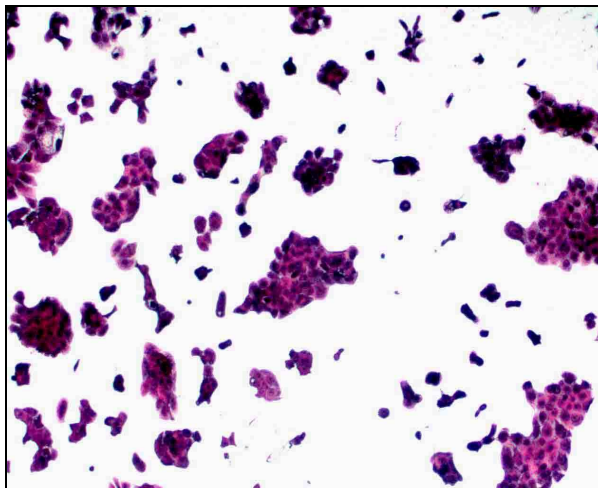




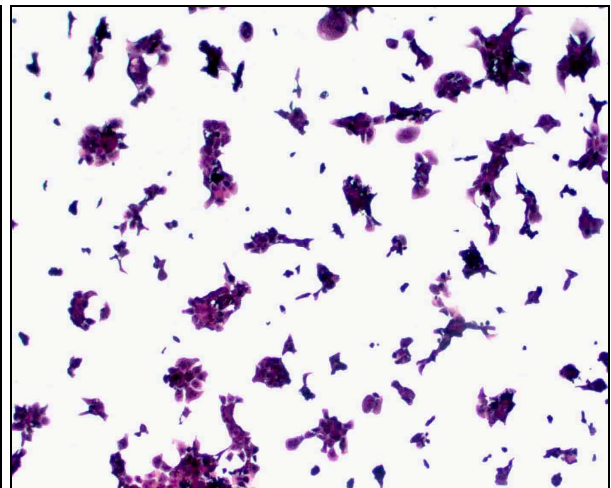
11A) 1,56 µmolar Cisplatininkubation ohne LLLT



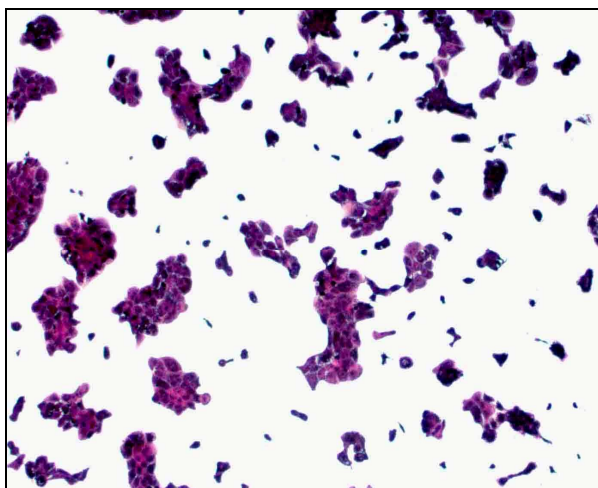
11B) 1,56 µmolar Cisplatininkubation mit LLLT



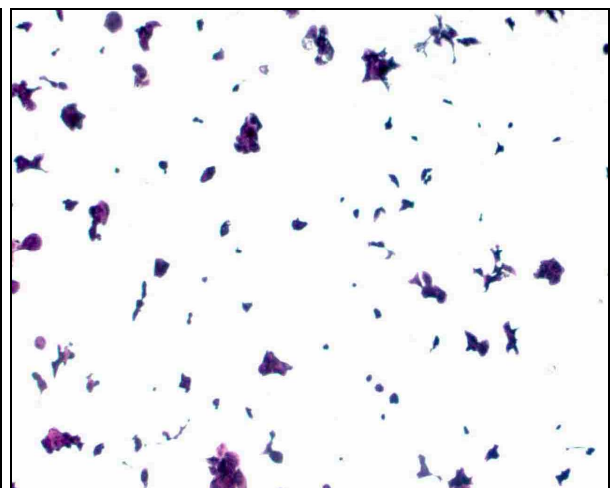
11C) 3,25 µmolar Cisplatininkubation ohne LLLT



11D) 3,25 µmolar Cisplatininkubation mit LLLT

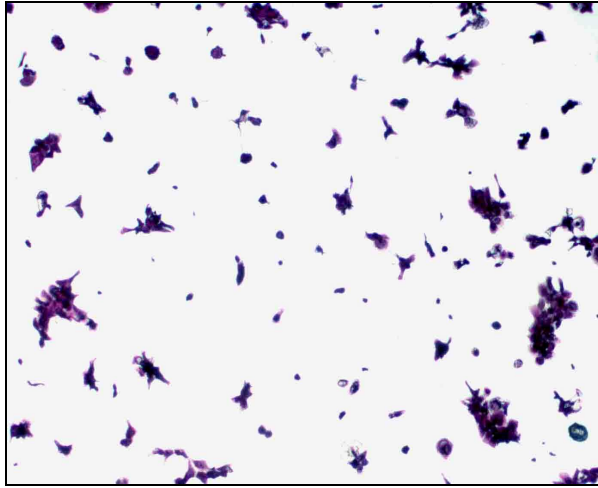


11E) 6,5 µmolar Cisplatininkubation ohne LLLT

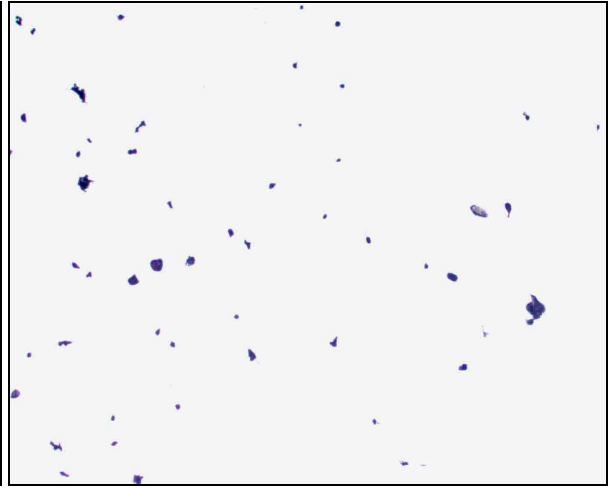


11F) 6,5 µmolar Cisplatininkubation mit LLLT

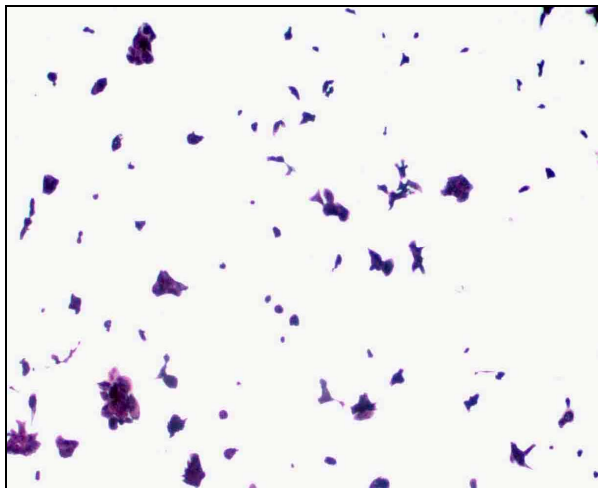
**Abbildung 11: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen**  
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung



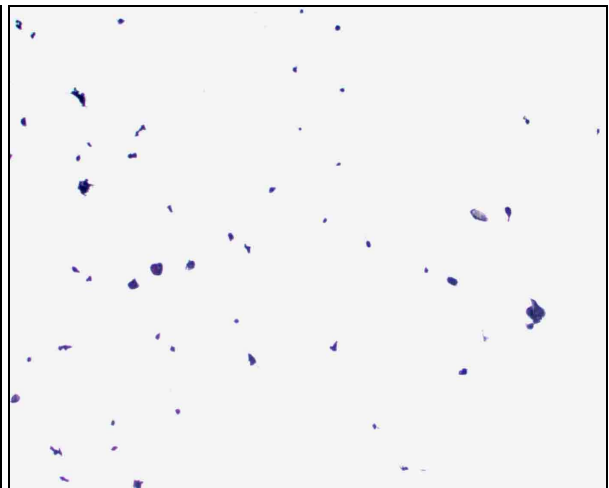
12A) 13 µmolar Cisplatininkubation ohne LLLT



12B) 13 µmolar Cisplatininkubation mit LLLT



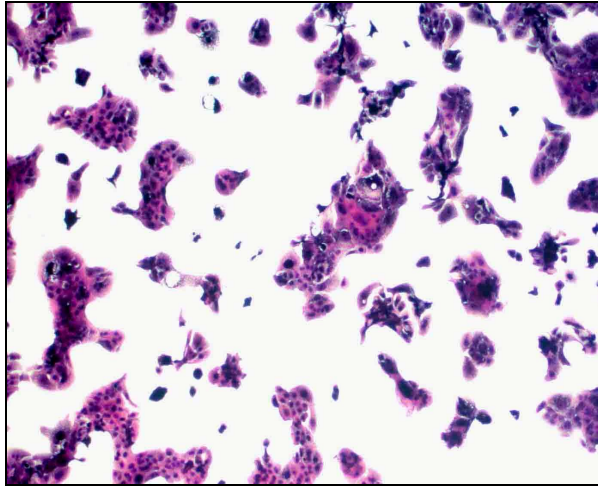
12C) 26 µmolar Cisplatininkubation ohne LLLT



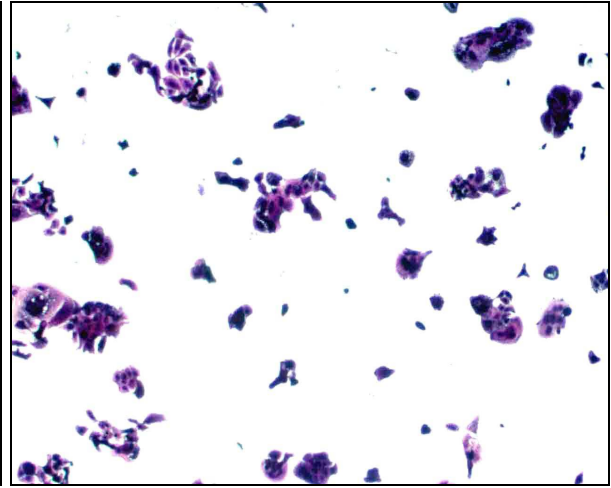
12D) 26 µmolar Cisplatininkubation mit LLLT

**Abbildung 12: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen**  
H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung

Unter Zolendronsäureexposition dieser Zelllinie fand sich dieses Bild der strahlenbedingten Toxizitätssteigerung nur bei einer Konzentration von 200 µmolar Zolendronsäure. Es konnten vermehrt morphologische Zeichen des Zellstress mit einer signifikant Reduktion der Zellzahl beobachtet werden (Abbildung 13B).



13A) 200  $\mu$ molar Zoledronsäure ohne LLLT



13B) 200  $\mu$ molar Zoledronsäure mit LLLT

**Abbildung 13: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen**

H.E.-Färbung, 5 fache Vergrößerung

## **4. Kapitel: Diskussion**

### **4.1. Problematik in der Zytostatikatherapie von Kopf-Hals-Tumoren**

Die beiden hier verwendeten Zytostatika Cisplatin und Zolendronsäure finden heute eine breite Anwendung in der onkologischen Therapie.

Cisplatin ist beispielsweise ein fester Bestandteil der Chemotherapie von Kopf-Hals-Tumoren (Ye et al., 2013), während Zolendronsäure vorwiegend bei skelettalen Metastasen von Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinomen eingesetzt wird (Roodman, 2004). Leider ist eine Cisplatinchemotherapie von zahlreichen, oft die Therapie limitierenden, Nebenwirkungen begleitet. Am häufigsten werden hier Anämie, Übelkeit, Erbrechen, Oto-, Nephro- und Neurotoxizität beobachtet (Rajeswaran et al., 2008; Bishop et al., 1987).

In Bezug auf den klinischen Einsatz von Bisphosphonaten wie Zolendronsäure ist die bereits erwähnte Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrose des Kiefers (BRONJ) besonders hervorzuheben (Khosla et al., 2007).

Da mit wiederholten Anwendungen des jeweiligen Zytostatikums das Risiko für Nebenwirkungen potentiell steigt und die Heilungsrate von Kopf-Hals-Tumoren in der Literatur im Schnitt mit 21% angegeben wird (Schwartz et al., 2000), liegt der Fokus der aktuellen onkologischen Forschung in der Entwicklung neuer Therapieformen und Konzepte.

### **4.2. Neue Therapieansätze in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren**

Die photodynamische Therapie erhält als minimalinvasive Therapie zunehmend Einzug in die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren (Jerjes et al., 2009; Jerjes et al., 2011). Vorteile sind das Fehlen von lang anhaltenden Nebenwirkungen, eine nahezu unbegrenzte Wiederholbarkeit und eine gute Verträglichkeit mit anderen

Behandlungsformen wie Bestrahlung und Chemotherapie (Karakullukcu et al., 2011).

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer Chemotherapie in Kombination mit einer Low-Level-Laserbestrahlung auf den zellulären Stoffwechsel untersucht. Mögliche klinische Anwendungen dieses Therapiekonzeptes, welches analog zu einer PDT ein Chemotherapeutikum als Photosensibilisator benutzt, könnten Zysten und lokale nicht maligne Hauttumoren sein.

### **4.3. Zytostatika als mögliche Photosensibilisatoren**

Als mögliches Beispiel wäre der keratozystisch odontogene Tumor (KCOT) zu nennen, der nach der WHO Klassifikation im Jahre 2005 von der odontogenen Keratozyste zum keratozystisch odontogenen Tumor umklassifiziert wurde (Bhargava et al., 2012). Dieser tritt meist im posterioren Bereich der Mandibula auf, vorwiegend zwischen dem 10. und 30. Lebensjahr, wobei Männer bevorzugt betroffen sind (Pitak-Arnop et al., 2009; Lam et al., 2000). Die Klinik dieser Tumorentität ist durch ein lokal aggressives Wachstumsmuster, eine hohe Rezidivrate und ein mögliches multiples Auftreten bei genetischer Disposition, wie dem Gorlin-Goltz-Syndrom, gekennzeichnet (Hahn et al., 1996). Die klinische Symptomatik wird als eher unspezifisch beschrieben und ist meist durch Sekundärinfektionen mit Schwellungen, Schmerzen oder pathologischen Frakturen gekennzeichnet (Stoelinga, 2003). Nach chirurgischer Therapie in Form einer Enukleation (Entfernung eines abgegrenzten, bekapselten Gewebebereichs) wird in der Literatur eine Rezidivrate zwischen 12 und 58 % angegeben (Blanas et al., 2000). Um nach Enukleation verbliebene vitale Tumorzellen abzutöten, wird der Operationssitus mit Carnoyscher Lösung, einem Alkohol-Chloroform-Essigsäuregemisch (im Verhältnis 6:3:1) mehrfach gespült, was zu einer signifikanten Senkung der Rezidivhäufigkeit führt (Voorsmit, 2010; Voorsmit, 1985). Eine mögliche Alternative zur Spülung mit Carnoyscher Lösung wäre nach erfolgter chirurgischer Zystektomie die lokale Installation eines Zytostatikums wie Zolendronsäure. Für diese konnte bereits im Tiermodell gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, die Knocheninfiltration von Plattenepithelkarzinomen zu verringern und die Knochenresorption wie auch die tumorinduzierten Osteolysen zu reduzieren

(Martin et al., 2013; Martin et al., 2010; Wypij et al., 2008). In Kombination mit einer Laserbestrahlung, wäre auch eine ähnliche zytotoxische Wirkung auf verbliebene KCOT-Zellen möglich.

Nach wie vor ist für maligne Tumoren mit ihrem invasiven Wachstumsmuster die chirurgische Therapie der Goldstandard. In der Behandlung von oralen Präkanzerosen, wie Leukoplakien, werden zunehmend Laser gestützte Technologien eingesetzt. Eine Möglichkeit ist die von Chainani-Wu et al. beschriebene Vaporisation (Verdampfung von Gewebe) (Chainani-Wu et al., 2013). Aber auch in Kombination mit verschiedenen Photosensibilisatoren bei der PDT sind klinische Ansätze in der Therapie von oralen Leukoplakien erfolgreich getestet worden. Pietruska et al. zeigte eine deutliche Reduktion der Leukplakiegröße unter Chlorine 6 (Photolon®) (Pietruska et al., 2013), während Wong et al. bei seinem Patientenkollektiv Aminolävulinsäure mit dem gleichen Effekt verwendete (Wong et al., 2013). Folglich könnte anstatt eines klassischen Photosensibilisators auch eine topische Zytostatikaaanwendung in Form von Cisplatin oder Zolendronsäure mit einer additiven Laserbestrahlung klinische Anwendung in der Therapie der oralen Leukoplakie finden.

Im Rahmen eines solchen Modells wäre auch alternativ zu einer topischen Applikation eine systemische Gabe des Photosensibilisators zu diskutieren. Ein Beispiel hierfür wäre der Hedgehog Antikörper Vismodegib. Er ist Teil der Chemotherapie des metastasierten Basalzellkarzinoms (Epstein, 2008; Proctor et al., 2014). Eine additive lokale Low-Level-Lasertherapie könnte zu einer Toxizitätssteigerung im Tumorgewebe führen.

#### **4.4. Einfluss von Cisplatin und Zolendronsäure auf die zelluläre Bioviabilität**

In dieser Arbeit wurden HNSCC-UM-3 Tumorzellen und Fibroblasten analog zur KCOT Zelle verwendet, um in einem Pilotversuch den Effekt einer Kombination von lokaler Chemotherapie durch Cisplatin bzw. Zolendronsäure mit einer Laserbestrahlung auf den zellulären Stoffwechsel zu untersuchen.

Bei Fibroblasten konnte eine signifikante Abnahme der Zellbioviabilität bei den höchsten Cisplatinkonzentrationen (13 und 26  $\mu$ molar) beobachtet werden, im

Vergleich dazu war dies bei HNSCC-UM-3 Tumorzellen für eine breite Konzentrationsspanne von 3,25 bis 26  $\mu$ molar der Fall. Eine Inkubation von Fibroblasten mit Zolendronsäure wirkte ebenfalls nur bei den höchsten Konzentrationen (100 und 200  $\mu$ molar) zytotoxisch. Bei HNSCC-UM-3 Tumorzellen ließ sich bei keiner Konzentration eine signifikante zytotoxische Wirkung beobachten. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die auch eine zytotoxische Wirkung von Zolendronsäure auf Fibroblasten belegen konnten (Basso et al., 2013; Acil et al., 2012; Draenert et al., 2012). Die für HNSCC-UM-3 Zellen beobachtete dosisabhängige Cisplatinsensibilität findet Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnisse für diese Zelllinie (Martens-de Kemp et al., 2013).

#### **4.5. Einfluss einer Bestrahlung auf die Zytotoxizität von Cisplatin und Zolendronsäure**

Eine gleichzeitige Low-Level-Laserbestrahlung von Fibroblasten steigerte die Zytotoxizität von Cisplatin bei Konzentrationen von 13 und 26  $\mu$ molar sowie von Zolendronsäure bei 100 und 200  $\mu$ molar. Bei der verwendeten Tumorzelllinie HNSCC-UM-3 wurde die Cisplatintoxizität in einem Bereich von 3,25 bis 26  $\mu$ molar verstärkt. Zolendronsäure wirkte alleine nicht zytotoxisch, reduzierte aber in einer Konzentration von 200  $\mu$ molar mit simultaner Bestrahlung die Zellbioviabilität von HNSCC-UM-3 Zellen signifikant.

Dies stimmt mit bereits publizierten Arbeiten anderer Forschergruppen überein. So konnte von Ge et al. sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* eine strahlenbedingte Steigerung der Cisplatintoxizität für Colonkarzinomzellen beobachtet werden (Ge et al., 2011). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Arbeitsgruppe von Uehara et al. für Plattenepithelkarzinomzellen im Tiermodell. Eine intraperitoneale Cisplatinapplikation steigerte signifikant die tumorablativ Wirkung der nachfolgenden Photodynamischen Therapie (Uehara et al., 2006). *In-vitro* wurde für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom demonstriert, dass Carboplatin synergistisch die Wirkung einer PDT steigert (Biswas et al., 2013). Den erwähnten Arbeiten ist jedoch gemeinsam, dass im Gegensatz zu dem hier verwendeten Versuchsaufbau ein Photosensibilisator verwendet worden ist. Ge et al. verwendeten Photogem (Ge et

al., 2011), Uehara et al. Photofrin (Uehara et al., 2006) und Biswas et al. Radachlorin (Biswas et al., 2013).

Photosensibilisator-unabhängige strahlenbedingte Toxizitätssteigerungen für Cisplatin bei Plattenepithelkarzinomzellen, wie sie auch in dieser Arbeit festgestellt wurden, sind auch von anderen Forschergruppen postuliert worden: von Kanekal et al. (Kanekal et al., 2009) und Paiva et al. *in-vivo* (Chung et al., 2003; Paiva et al., 1998) sowie von Chung et al. *in-vivo* und *in-vitro* (Chung et al., 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Laserstrahlung bei den hier untersuchten Zelllinien zu einer Toxizitätszunahme von Cisplatin und Zolendronsäure führt. Generell waren die HNSCC-UM-3 Tumorzellen bei einem großen Cisplatinkonzentrationsgradienten deutlich photosensibler als Fibroblasten, bei denen die strahlenbedingte Toxizitätssteigerung erst bei submaximalen und maximalen Cisplatinkonzentrationen gesehen wurde. Diese Ergebnisse spiegelten sich in der histologischen Analyse wieder.

Völlig ohne gleichzeitige Zytostatikainkubation wurde ein biostimulatorischer Effekt einer Laserbestrahlung auf die Zellfunktion der jeweiligen Zelllinie erkennbar. Ähnliche Ergebnisse sind von Bayram et al. für Knochentumorzellen (Bayram et al., 2013) und von Giuliani et al. für neuronale Zellen (Giuliani et al., 2009) beschrieben worden.

## 4.6. Schlussfolgerung

Hinsichtlich der Wirkung der hier verwendeten Laserstrahlung auf den zellulären Stoffwechsel lässt sich ein inverser Effekt beobachten. Ohne simultane Zytostatikaexposition stimuliert sie den zellulären Metabolismus, in Kombination mit einer Noxe steigerte sie deren Toxizität. Da in diesem Versuchsaufbau sowohl zwei verschiedene Zelllinien als auch zwei verschiedene Zytostatika verwendet wurden, könnte man vermuten, dass die Strahlenwirkung auf die Zellen unabhängig vom Zelltyp und der Art der Noxe ist.

Eine mögliche Erklärung könnte eine direkte Wirkung des Laserlichtes auf die Mitochondrien sein. Es wird vermutet, dass diese Form der Bestrahlung in der Lage ist, die mitochondriale Atmungskette direkt zu stimulieren (Karu and Kolyakov, 2005). Eine so gesteigerte mitochondriale Aktivität als Schlüssel für einen erhöhten Zellumsatz könnte die beobachtete Zytotoxizitätssteigerung von Cisplatin und



Zolendronsäure erklären. Nachfolgende Studien sollten Untersuchungen auf subzellulärer Ebene einschließen, um eine mögliche Erklärung auf dieser Ebene zu finden. Des Weiteren wäre es interessant, andere Zelltypen in Kombination mit anderen Noxen sowie anderen Bestrahlungsdosen zu vergleichen.

Die hier beobachteten Toxizitätssteigerungen von Cisplatin und Zolendronsäure könnten für die Entwicklung neuer Therapieansätze in der Behandlung keratozystisch odontogener Tumoren wie auch als supportive Maßnahme bei systemischer Chemotherapie von Hauttumoren von Interesse sein.

## 5. Kapitel: Zusammenfassung/Summary

### 5.1. Zusammenfassung

Eine alleinige Laserbestrahlung (LLLT = Low-Level-Lasertherapie) wird heute als lokal-konservative Therapie zur Reduktion einer Entzündungsreaktion, Förderung der Wundheilung und unterstützend bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen verwendet. Als mögliche Erklärung hierfür wird eine direkte biostimulative Wirkung des Laserlichtes auf die Mitochondrien postuliert, die auch als Photobiomodulation bezeichnet wird. Die Kombination von Laserlicht mit einem Photosensibilisator ist die Grundlage der photodynamischen Therapie (PDT). Sie wird in der Zahnmedizin bei Parodontitiden, Periimplantitiden und Endodontitiden als antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) gegen Prokaryonten (HELBO® TheraLite Lasers) eingesetzt. In der Dermatologie findet dieses Verfahren bei benignen und malignen Hautveränderungen Anwendung.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt einer Kombination von Low-Level-Laserbestrahlung (analog einer PDT) mit Cisplatin oder Zolendronsäure *in-vitro* auf den zellulären Stoffwechsel zu untersuchen. Daraus könnten sich neue Therapieoptionen für Tumoren und Zysten im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich entwickeln.

Hierfür wurden primäre humane Fibroblasten sowie eine HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma) Tumorzelllinie (UM-SCC-3) entweder mit steigenden Konzentrationen von Cisplatin oder Zolendronsäure inkubiert und mit einem nicht thermischen Diodenlaser (670 nm, 2 Minuten, 100mW/ cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Daran schloss sich entweder eine Zellfunktionsmessung mittels XTT-Assay oder eine histologische Untersuchung durch eine H.E.-Färbung an.

Eine alleinige Bestrahlung steigerte den Stoffwechsel der beiden Zelllinien im XTT-Assay im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Unter Zytostatikaexposition mittels Cisplatin oder Zolendronsäure konnte eine strahlenbedingte Toxizitätssteigerung in der XTT-Messung im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrollgruppe beobachtet werden. Es zeigte sich eine höhere Photosensibilität der Tumorzelllinie für Cisplatin im Vergleich zu Fibroblasten. Bei primärer Zolendronsäureresistenz der

Tumorzelllinie konnte eine gleichzeitige Laserbestrahlung die Zellbioviabilität im Vergleich zu einer alleinigen Zolendronsäureinkubation signifikant reduzieren. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der histologischen Auswertung wieder.

Die hier vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass eine Low-Level-Laserbestrahlung zu einer lokalen Toxizitätssteigerung von Chemotherapeutika führen kann. Dies könnte, ähnlich einer Photodynamischen Therapie, in der Behandlung von Tumoren und Zysten von Interesse sein. Mögliche klinische Anwendungsbeispiele wären der keratozystisch odontogene Tumor (KCOT) sowie supportiv beim metastasierten Basalzellkarzinom unter systemischer Chemotherapie.

## 5.2. Summary

Today, the biostimulatory effect of low-level laser therapy (LLLT) is mainly used in supportive care of chronic diseases. Beneficial effects in terms of wound healing, tissue reparation, relieving inflammation and as analgesic for neurological disorders have been reported. Furthermore, it is postulated that this kind of radiation as a direct bio-stimulatory effect on mitochondria. This is also named as photobiomodulation. The advancement of this technology is the photodynamic therapy (PDT), where a photosensitizer is activated by light of a specific wavelength. In this described combination, it is used in dental medicine as an antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in the treatment of periodontitis, peri-implantitis or endodontic therapy. In modern dermatology, PDT is widely used against different malignant or non-malignant cutaneous diseases.

The purpose of this *in-vitro* study was to investigate the effect of LLLT with cisplatin and zolendronic acid as potential photosensitizer on the bioviability of human benign and malignant cells. This could be interesting in the development of new therapeutic options for cancer in the craniomaxillofacial region.

Primary human fibroblasts (PHF) and head and neck squamous cell carcinoma cells (HNSCC-UM-3) were treated with different concentrations of zolendronic acid or cisplatin and were irradiated twice with a non-thermal diode laser (wavelength 670nm, 2 minutes, 100mW/ cm<sup>2</sup>). Non-irradiated cells served as control groups. Cell viability was tested by XTT-assay. For histomorphological analysis a H.E. staining was performed.

Laser therapy significantly increased bioviability for both cell lines. For human primary fibroblasts, LLLT increased the cytotoxicity of applied chemotherapeutic substances. When HNSCC-UM-3 cells were incubated with cisplatin, an high photosensibilization was observed in comparison to primary human fibroblasts. In cases of incubation with zolendronic acid, similar to fibroblasts, laser therapy lowered cell viability at the highest concentration only, eventhough zolendronic acid alone was not seen as cytotoxic.

Within the limits of this study, it can be concluded that LLLT is able to enhance the cytotoxicity of local applied chemotherapeutic agents like cisplatin and zolendronic acid. This could be interesting in the development of new therapeutic options using chemotherapeutic drugs as a possible photosensitizer. Possible clinical applications could be the keratocystic odontogenic tumor (KCOT) as well as a supportive tool in terms of metastatic skin cancer, like basal-cell carcinoma, in combination with a systemic chemotherapy.

## 6. Kapitel: Danksagung

Herrn Univ. Prof. Dr. Dr. Neff danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitäts-Klinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg.

Herrn apl. Prof. Dr. Dr. Draenert (leitender Oberarzt der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitäts-Klinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg) danke ich für die Idee des interessanten Themas und die lehrreichen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn apl. Prof Dr. med. Robert Mandic sowie Herrn Dr. Dr. Peer Kämmerer für Ihre Unterstützung bei dieser Arbeit sowie für die Einarbeitung und Assistenz im Labor und nicht zuletzt für Anregungen zum Schreiben und für die Korrekturarbeiten.

Bei Frau Roswitha Peldszus und bei Frau Maria Sadowski möchte ich mich für die gemeinsame Zeit im Labor und die Hilfestellungen bei der praktischen Umsetzung bedanken.

## **7. Kapitel: Lebenslauf**

## **8. Kapitel: Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten (in alphabetischer Reihenfolge ohne akademischen Grad):

Arweiler, Braun, Coca, Draenert, Fischer, Flores-de-Jacoby, Frankenberger, Himpel, Höffken, Huster, Jablonski-Momeni, Korbmacher-Steiner, Lotzmann, Mengel, Moll, Neff, Peleska, Pieper, Roggendorf, Weber

Meine akademischen Lehrer in Homburg (Saar) waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten (in alphabetischer Reihenfolge ohne akademischen Grad):

Becker, Bellmann, Böhm, Buchter, Falkai, Feldmann, Fleckenstein, Gärtner, Graf, Hegetschweiler, Heinz, Henn, Herrmann, Hoth, Jung, Käsmann-Kellner, Kienecker, Köhler, Köllner, Kohn, Larsen, Lipp, Mannowetz, Montenarh, Pajonk, Pees, Pfreundschuh, Pohlemann, Pospiech, Schäfers, Schilling, Schmid, Schmidt, Schyma, Seitz, Speicher, Stahl, Sybrecht, Tschernig, Verse, Wennemuth, Wilkens, Wilske, Zeuzem, Zimmermann

## 9. Kapitel: Literaturverzeichnis

Ramsay PS. Heinrich Hertz, the father of frequency. *Neurodiagn J* 2013: 53(1): 3-26.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD and Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 2012: 40(2): 516-33.

Sowa P, Rutkowska-Talipska J, Rutkowski K, Kosztyla-Hojna B and Rutkowski R. Optical radiation in modern medicine. *Postepy Dermatol Alergol* 2013: 30(4): 246-51.

McGuff PE, Bushnell D, Soroff HS and Deterling RA, Jr. Studies of the Surgical Applications of Laser (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). *Surg Forum* 1963: 14(143-5).

Farkas JP, Hoopman JE and Kenkel JM. Five parameters you must understand to master control of your laser/light-based devices. *Aesthet Surg J* 2013: 33(7): 1059-64.

Roodenburg JL, Witjes MJ, de Veld DC, Tan IB and Nauta JM. [Lasers in dentistry 8. Use of lasers in oral and maxillofacial surgery]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2002: 109(12): 470-4.

Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG and Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg* 1995: 53(4): 442-7.

Lampl Y, Zivin JA, Fisher M, Lew R, Welin L, Dahlof B, Borenstein P, Andersson B, Perez J, Caparo C, Ilic S and Oron U. Infrared laser therapy for ischemic stroke: a new treatment strategy: results of the NeuroThera Effectiveness and Safety Trial-1 (NEST-1). *Stroke* 2007: 38(6): 1843-9.

Barrett DW and Gonzalez-Lima F. Transcranial infrared laser stimulation produces beneficial cognitive and emotional effects in humans. *Neuroscience* 2013: 230(13-23).

Greco M, Guida G, Perlino E, Marra E and Quagliariello E. Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun* 1989: 163(3): 1428-34.

Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol* 2002; 76(2): 164-70.

Pastore D, Greco M, Petragallo VA and Passarella S. Increase in  $\dot{H}^+/e^-$  ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Mol Biol Int* 1994; 34(4): 817-26.

Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B* 1999; 49(1): 1-17.

Chen AC, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS and Hamblin MR. Low-level laser therapy activates NF- $\kappa$ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One* 2011; 6(7): e22453.

Karu TI and Kolyakov SF. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* 2005; 23(4): 355-61.

Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL and Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother* 2001; 2(6): 917-27.

Oleinick NL, Morris RL and Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1(1): 1-21.

Igney FH and Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(4): 277-88.

Calzavara-Pinton PG, Venturini M and Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21(3): 293-302.

Allison RR and Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013; 46(1): 24-9.

Kato H. [History of photodynamic therapy--past, present and future]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; 23(1): 8-15.



Brancaleon L and Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2002; 17(3): 173-86.

Kostovic K, Pastar Z, Ceovic R, Mokos ZB, Buzina DS and Stanimirovic A. Photodynamic therapy in dermatology: current treatments and implications. *Coll Antropol* 2012; 36(4): 1477-81.

Issa MC and Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. *An Bras Dermatol* 2010; 85(4): 501-11.

Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F and Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci* 2012; 27(3): 615-20.

Schar D, Ramseier CA, Eick S, Arweiler NB, Sculean A and Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24(1): 104-10.

Novaes AB, Jr., Schwartz-Filho HO, de Oliveira RR, Feres M, Sato S and Figueiredo LC. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: microbiological profile. *Lasers Med Sci* 2012; 27(2): 389-95.

Shrestha A and Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod* 2012; 38(9): 1275-8.

Rosenberg B, Vancamp L and Krigas T. INHIBITION OF CELL DIVISION IN *ESCHERICHIA COLI* BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature* 1965; 205(698-9).

Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE and Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222(5191): 385-6.

Stathopoulos GP, Dafni UG, Malamos NA, Rigatos S, Kouvatses G and Moschopoulos N. Induction chemotherapy in non small cell lung cancer stage IIIa-b and IV and second-line treatment. *Anticancer Res* 1999; 19(4C): 3543-8.

Geiger JL, Lazim AF, Walsh FJ, Foote RL, Moore EJ, Okuno SH, Olsen KD, Kasperbauer JL, Price DL, Garces YI, Ma DJ, Neben-Wittich MA, Molina JR, Garcia JJ and Price KA. Adjuvant chemoradiation therapy with high-dose versus weekly cisplatin for resected, locally-advanced HPV/p16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2014:

Thissen AK, Pfister D and Heidenreich A. [Muscle invasive bladder cancer after radical cystectomy. Prognostic factors of adjuvant chemotherapy]. *Urologe A* 2013: 52(9): 1233-41.

Oliver T and Mead G. Testicular cancer. *Curr Opin Oncol* 1993: 5(3): 559-67.

Rodenhuis S, de Wit R, de Mulder PH, Keizer HJ, Sleijfer DT, Lalisang RI, Bakker PJ, Mandjes I, Kooi M and de Vries EG. A multi-center prospective phase II study of high-dose chemotherapy in germ-cell cancer patients relapsing from complete remission. *Ann Oncol* 1999: 10(12): 1467-73.

Basu A and Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids* 2010: 2010(

Zamble DB and Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 1995: 20(10): 435-9.

Sedletska Y, Giraud-Panis MJ and Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005: 5(3): 251-65.

Boulikas T and Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncol Rep* 2003: 10(6): 1663-82.

Reed E, Ostchega Y, Steinberg SM, Yuspa SH, Young RC, Ozols RF and Poirier MC. Evaluation of platinum-DNA adduct levels relative to known prognostic variables in a cohort of ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1990: 50(8): 2256-60.

Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005: 4(4): 307-20.

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C and Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59(4): 657-63.

Lieberthal W and Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996; 271(3 Pt 2): F477-88.

Rosenberg B. Noble metal complexes in cancer chemotherapy. *Adv Exp Med Biol* 1977; 91(129-50).

Hill JM and Speer RJ. Organo-platinum complexes as antitumor agents (review). *Anticancer Res* 1982; 2(3): 173-86.

Wong E and Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 1999; 99(9): 2451-66.

Decatris MP, Sundar S and O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(1): 53-81.

Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T and Morin PJ. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003; 3(4): 377-86.

Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R and Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 2004; 66(1): 25-32.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47): 7265-79.

Kartalou M and Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 2001; 478(1-2): 1-21.

Stojic L, Brun R and Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3(8-9): 1091-101.

Dempke W, Voigt W, Grothey A, Hill BT and Schmoll HJ. Cisplatin resistance and oncogenes--a review. *Anti-cancer drugs* 2000; 11(4): 225-36.

Reid IR. Pharmacotherapy of Paget's disease of bone. *Expert Opin Pharmacother* 2012; 13(5): 637-46.

Handler RP. Prior bisphosphonate therapy of osteoporosis attenuates and blocks response to subsequent parathyroid hormone. *J Clin Rheumatol* 2008; 14(2): 122-4.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF and Melton LJ, 3rd. Incidence of multiple myeloma in Olmsted County, Minnesota: Trend over 6 decades. *Cancer* 2004; 101(11): 2667-74.

Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004; 350(16): 1655-64.

Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist* 2004; 9 Suppl 4(3-13).

Russell RG and Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 25(1): 97-106.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 1996; 18(2): 75-85.

Frith JC, Monkkonen J, Auriola S, Monkkonen H and Rogers MJ. The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(9): 2201-10.

Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068(367-401).

Basso FG, Pansani TN, Oliveira CF, Turrioni AP, Soares DG, Hebling J and Costa CA. Cytotoxic effects of zoledronic Acid on human epithelial cells and gingival fibroblasts. *Braz Dent J* 2013; 24(6): 551-8.

Reszka AA and Rodan GA. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5(1): 65-74.

Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G and Budillon A. Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(1): 7-26.

Ural AU, Avcu F, Candir M, Guden M and Ozcan MA. In vitro synergistic cytoreductive effects of zoledronic acid and radiation on breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8(4): R52.

Alcaraz M, Olivares A, Achel DG and Alcaraz-Saura M. Effects of bisphosphonates in combination with ionizing radiation and antioxidants on the growth of prostate and melanoma cells lines. *Anticancer Res* 2013; 33(8): 3217-24.

Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Graham R, Russell G and Croucher PI. Anti-tumour activity of bisphosphonates in human myeloma cells. *Leuk Lymphoma* 1998; 32(1-2): 129-38.

Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Sakellariou GT, Bisbinas I, Gkiomisi A, Delaroudis S, Gerou S, Ballaouri I, Oikonomou D and Papapoulos SE. Acute phase response following intravenous zoledronate in postmenopausal women with low bone mass. *Bone* 2012; 50(5): 1130-4.

Adami S and Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf* 1996; 14(3): 158-70.

Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone* 2009; 44(1): 4-10.

Migliorati CA, Schubert MM, Peterson DE and Seneda LM. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer* 2005; 104(1): 83-93.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF and Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 2008; 23(6): 826-36.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS and Maiya GA. Low level helium neon laser therapy for chemoradiotherapy induced oral mucositis in oral cancer patients - a randomized controlled trial. *Oral Oncol* 2012; 48(9): 893-7.

Gautam AP, Fernandes DJ, Vidyasagar MS, Maiya AG and Nigudgi S. Effect of low-level laser therapy on patient reported measures of oral mucositis and quality of life in head and neck cancer patients receiving chemoradiotherapy--a randomized controlled trial. *Support Care Cancer* 2013; 21(5): 1421-8.

Gouvea de Lima A, Villar RC, de Castro G, Jr., Antequera R, Gil E, Rosalmeida MC, Federico MH and Snitcovsky IM. Oral mucositis prevention by low-level laser therapy in head-and-neck cancer patients undergoing concurrent chemoradiotherapy: a phase III randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 82(1): 270-5.

Bayram H, Kenar H, Tasar F and Hasirci V. Effect of low level laser therapy and zoledronate on the viability and ALP activity of Saos-2 cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 42(1): 140-6.

Ge R, Ahn JC, Shin JI, Bahk CW, He P and Chung PS. An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem(R)-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). *Photomed Laser Surg* 2011; 29(3): 155-60.

Biswas R, Chung PS, Moon JH, Lee SH and Ahn JC. Carboplatin synergistically triggers the efficacy of photodynamic therapy via caspase 3-, 8-, and 12-dependent pathways in human anaplastic thyroid cancer cells. *Lasers Med Sci* 2013;

Chung PS, Kim HG, Rhee CK and Saxton RE. Anticancer effect of combined intratumor cisplatin injection and interstitial KTP laser therapy on xenografted squamous cell carcinoma. *J Clin Laser Med Surg* 2003; 21(1): 23-7.

Kanekal S, Joo J, Bublik M, Bababeygy A, Loh C, Castro DJ, Sercarz JA and Paiva MB. Retention of intratumor injections of cisplatin in murine tumors and the impact on laser thermal therapy for cancer treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266(2): 279-84.

Paiva MB, Graeber IP, Castro DJ, Suh MJ, Paek WH, Eshraghi AA and Saxton RE. Laser and cisplatin for treatment of human squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 1998; 108(9): 1269-76.

Krause CJ, Carey TE, Ott RW, Hurbis C, McClatchey KD and Regezi JA. Human squamous cell carcinoma. Establishment and characterization of new permanent cell lines. *Arch Otolaryngol* 1981; 107(11): 703-10.

Zhao Y, Guo Y and Gu X. Salvianolic Acid B, a potential chemopreventive agent, for head and neck squamous cell cancer. *J Oncol* 2011; 2011(534548).

Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D and Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988; 48(17): 4827-33.

Ye AY, Hay JH, Laskin JJ, Wu JS and Ho CC. Toxicity and outcomes in combined modality treatment of head and neck squamous cell carcinoma: cisplatin versus cetuximab. *J Cancer Res Ther* 2013; 9(4): 607-12.

Rajeswaran A, Trojan A, Burnand B and Giannelli M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Lung Cancer* 2008; 59(1): 1-11.

Bishop JF, Raghavan D, Stuart-Harris R, Morstyn G, Aroney R, Kefferd R, Yuen K, Lee J, Gianoutsos P, Olver IN and et al. Carboplatin (CBDCA, JM-8) and VP-16-213 in previously untreated patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1987; 5(10): 1574-8.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, Gagel RF, Gilsanz V, Guise T, Koka S, McCauley LK, McGowan J, McKee MD, Mohla S, Pendrys DG, Raisz LG, Ruggiero SL, Shafer DM, Shum L, Silverman SL, Van Poznak CH, Watts N, Woo SB and Shane E. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2007; 22(10): 1479-91.

Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, Shaligram C and Portugal LG. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2000; 22(1): 34-41.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Nhembe F, Bhandari R, Mackay S, Shah P, Mosse CA, Brookes JA, Morley S and Hopper C. Ultrasound-guided photodynamic therapy for deep seated pathologies: prospective study. *Lasers Surg Med* 2009; 41(9): 612-21.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S and Hopper C. Photodynamic therapy outcome for oral dysplasia. *Lasers Surg Med* 2011; 43(3): 192-9.

Karakullukcu B, van Oudenaarde K, Copper MP, Klop WM, van Veen R, Wildeman M and Bing Tan I. Photodynamic therapy of early stage oral cavity and oropharynx neoplasms: an outcome analysis of 170 patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011; 268(2): 281-8.

Bhargava D, Deshpande A and Pogrel MA. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT)--a cyst to a tumour. *Oral Maxillofac Surg* 2012; 16(2): 163-70.

Pitak-Arnnop P, Chaine A, Dhanuthai K, Bertrand JC and Bertolus C. Pathology Quiz Case 1. Keratocystic odontogenic tumor (KCOT). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135(9): 944, 946-7.

Lam KY and Chan AC. Odontogenic keratocysts: a clinicopathological study in Hong Kong Chinese. *Laryngoscope* 2000; 110(8): 1328-32.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B and Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 1996; 85(6): 841-51.

Stoelinga PJ. Etiology and pathogenesis of keratocysts. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2003; 15(3): 317-24.



Blanas N, Freund B, Schwartz M and Furst IM. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90(5): 553-8.

Voorsmit RA. [Dissertations 25 years after date 22. Surgical treatment of keratocysts]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2010; 117(5): 278-82.

Voorsmit RA. The incredible keratocyst: a new approach to treatment. *Dtsch Zahnarztl Z* 1985; 40(6): 641-4.

Martin CK, Dirksen WP, Carlton MM, Lanigan LG, Pillai SP, Werbeck JL, Simmons JK, Hildreth BE, 3rd, London CA, Toribio RE and Rosol TJ. Combined zoledronic acid and meloxicam reduced bone loss and tumour growth in an orthotopic mouse model of bone-invasive oral squamous cell carcinoma. *Vet Comp Oncol* 2013:

Martin CK, Werbeck JL, Thudi NK, Lanigan LG, Wolfe TD, Toribio RE and Rosol TJ. Zoledronic acid reduces bone loss and tumor growth in an orthotopic xenograft model of osteolytic oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2010; 70(21): 8607-16.

Wypij JM, Fan TM, Fredrickson RL, Barger AM, de Lorimier LP and Charney SC. In vivo and in vitro efficacy of zoledronate for treating oral squamous cell carcinoma in cats. *J Vet Intern Med* 2008; 22(1): 158-63.

Chainani-Wu N and Silverman S, Jr. Lesion characteristics and responses after CO2 laser vaporization in five patients With gingival leukoplakia. *J Calif Dent Assoc* 2013; 41(10): 759-62, 765.

Pietruska M, Sobaniec S, Bernaczyk P, Cholewa M, Pietruski JK, Dolinska E, Skurska A, Duraj E and Tokajuk G. Clinical evaluation of photodynamic therapy efficacy in the treatment of oral leukoplakia. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013:

Wong SJ, Campbell B, Massey B, Lynch DP, Cohen EE, Blair E, Selle R, Shklovskaya J, Jovanovic BD, Skripkauskas S, Dew A, Kulesza P, Parimi V, Bergan RC and Szabo E. A phase I trial of aminolevulinic acid-photodynamic therapy for treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol* 2013; 49(9): 970-6.

Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(10): 743-54.

Proctor AE, Thompson LA and O'Bryant CL. Vismodegib: an inhibitor of the Hedgehog signaling pathway in the treatment of basal cell carcinoma. *Ann Pharmacother* 2014; 48(1): 99-106.

Acil Y, Moller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J and Simon MJ. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40(8): e229-35.

Draenert GF, Huetzen DO, Kammerer PW, Palarie V, Nacu V and Wagner W. Dexrazoxane shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated human cells in vitro and in the rabbit tibia model in vivo. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40(8): e369-74.

Martens-de Kemp SR, Dalm SU, Wijnolts FM, Brink A, Honeywell RJ, Peters GJ, Braakhuis BJ and Brakenhoff RH. DNA-bound platinum is the major determinant of cisplatin sensitivity in head and neck squamous carcinoma cells. *PLoS One* 2013; 8(4): e61555.

Uehara M, Inokuchi T and Ikeda H. Enhanced susceptibility of mouse squamous cell carcinoma to photodynamic therapy combined with low-dose administration of cisplatin. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(3): 390-6.

Giuliani A, Lorenzini L, Gallamini M, Massella A, Giardino L and Calza L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern Med* 2009; 9(8).

## 10. Kapitel: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Photobiomodulation (modifiziert nach Chung 2012) .....	8
Abbildung 2: Darstellung des Versuchaufbaues .....	19
Abbildung 3: Strukturformeln von Tetrazolium und Formazan (modifiziert nach Scudiero 1988) .....	21
Abbildung 4: XTT-Messung unter Cisplatininkubation .....	26
Abbildung 5: XTT-Messung unter Zolendronsäureinkubation.....	27
Abbildung 6: Histologische Untersuchung von Fibroblasten.....	28
Abbildung 7: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3.....	29
Abbildung 8: Histologische Untersuchung von Fibroblasten und HNSCC-UM-3 Tumorzellen.....	30
Abbildung 9: Histologische Untersuchung von Fibroblasten.....	31
Abbildung 10: Histologische Untersuchung von Fibroblasten.....	32
Abbildung 11: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen .....	33
Abbildung 12: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen .....	34
Abbildung 13: Histologische Untersuchung von HNSCC-UM-3 Tumorzellen .....	35

## 11. Kapitel: Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich dem Fachbereich Zahnmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der verstärkende Effekt einer Low-Level-Laserbestrahlung auf die Wirkung von Cisplatin und Zolendronsäure *in vitro*.“ aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Leitung von Professor Dr. med. Dr. med. dent. Guy-Florian Draenert ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung zur zahnmedizinischen Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in folgendem Publikationsorgan unter dem Titel „*Laser-enhanced cytotoxicity of zoledronic acid and cisplatin on human fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma cells.*“ veröffentlicht: *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*.

Außerdem werden die Ergebnisse dieser Arbeit auf dem Jahreskongress der DGMKG vom 11.-14. Juni 2014 dieses Jahres in Mainz als freier Vortrag mit dem Titel „*Der verstärkende Effekt einer Low-Level-Laserbestrahlung auf die Wirkung von Cisplatin und Zolendronsäure in-vitro.*“ von mir präsentiert werden.

Dr. med. Paul Heymann